日本水産学会誌

第二十三巻 第三号

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 23, No. 3, 1957

目　次

昭和三十二年
日本水産学会
The Japanese Society of Scientific Fisheries
TOKYO

CONTENTS

* In Japanese with synopsis in English.

All communications and publications should be addressed to :
Japanese Society of Scientific Fisheries, c/o Tokyo University of Fisheries, Shiba kaigandori 6-chome, Tokyo, Japan.

日本水産学会投稿規定

1. 報文の投稿者は本会員個人に限る。但し会員外の共同研究者を含むことは差支えない。
2. 報文は投稿者の原著で他の刊行物に未発表のものに限る。
3. 報文は総て本会に送付し，本会に到着した日を以つて，受付月日とし，受付けた原稿は総て編集長の指定する2名の編集理事が回覧し，掲載可と認めたものはそのまゝ受理する。この場合の受理月日は受付月日とする。編集理事が其のまゝ掲載することに疑義をいだいた場合は編集長にその旨報告する。この場合編集長は編集会議を招集，審議し，受理し得ないと認めた場合はその理由を附し，原著者に返却し，訂正を求める。この場合の受理月日は，学会が訂正原稿を受理した月日とする。受理した論文は，その受理月日の順に掲載する。但し，その報文又は報文抄録が印刷費著者負担の場合は，会誌を増頁して掲載する。抄録を希望する場合は本論文をそえて提出すること。
4. 原稿1篇の長さは原則として刷上り4頁（表題．200語の英文抄録を除き，図表の占める紙面を含め約 7000 字相当）とする。原稿一篇の学会負担の基準印刷費（7.200円）を超過した場合は著者が負担する。
5. 会員が会費又は著者として負担すべき印刷費の支払いを怠るときは，支払いのあるまでその会員の報文の受理又は掲載を見合せることがある。
6. 邦文報告には原則として 200 語以内の英文抄録（題名と著者名とを附記，名前は省略せぬこと，）を添える。
7. 図表には英文の説明をつける。邦文を併用してもよい。
8. 投稿の細目については別に定める注意書きに従う。

投稿に関する注意

1. 原稿を投稿するときには，本会所定の投稿カード（請求により配付する）に必要事項を記入し，之を原稿に添え本会に提出する。
2. 初校は原則として，著者が校正する（校正は迅速に行う事)。尚文章又は図，表の変更や追加は禁ずる。再校以後は編集部で校正する。
3. 英文抄録，図及び表の表題，説明等の英訳を希望される向はその原案を添えて投稿されたい。但し実費を申し受ける。
4. 別刷りの料金（X円）は次の式によつて算出される通りとする。X=(1+P)（N—50）円 P：頁数，N：別刷数（50 部を単位とする）従つて 50 部までは頁数に関らず無料である。特に表紙をつけることを希望される場合は，著者負担によつてこれをつける。(50 部当り 300 円)
5. 投稿後掲載までの間に著者の連絡先が変つたときには必ず通知されたい。

原稿の書き方

原稿は会誌体裁の統一，誤りの防止，編集印刷の便宜上次の諸規定を守られたい。既出報文との調和其の他のために例外を望まれる著者はその都度明記されたい。

1. **邦文原稿**は本会所定の原稿用紙にペンで横書きにし，記述は簡単明瞭にし新かなづかいを用いて難かしい漢字はさける。英文抄録は本文とは別葉にする。
2. **欧文原稿**は厚手の上質紙に2段送りのタイプで打つ。欧文本文以外の欧文個所はペン書きでもよいが必ず活字体を用いる。
3. **字体の指定**は右の如く赤で入れる。



Italic	**Gothic**	CAPITAL	CAP. & SMALL CAP.	うわつき（かたつき）	したつき

4. **表題** 主題・副題は別行に書き各々ピリオド（.）をつけない。第○報の場合はローマ数字（Ⅰ，Ⅱ）にして（——）でつなぎ数字の後に（.）をつける。
英文表題では第一語の他，名詞，副詞，形容詞，〔動詞は慣用に従う〕の頭文字は大文字にする。

5. **著者名** 邦文では連名の時は（・）で連ねる。ローマ字では名の頭を Capital 後は Small，姓の頭を Capital 後は Small Capital にする。連名の時は（,）で連ね最後の名の前を（and）で連ねる。（&）は用いない。末尾に（.）はつけない。

6. **所属** 著者名の下に（ ）で囲む。本文が邦文の時は英文の所属は入れない。但し著者が希望すれば脚註で入れてもよい。本文が英文の時は字体を *Italic* にする。

7. **図表** 表題，説明，内容とも英文で書く。必要ならば邦文併用もよい。番号は（Fig. 1. Table 1.）とする。番号，表題，説明は図ではその下に，表ではその上に入れる。表の細かい説明は下でもよい。邦文併用の時は邦文の番号（第1図，第1表）は省く。図表は必ず本文と別葉にし，本文中に挿入個所を赤で指定する。又本文中に引用する時は（Fig. 1, Table 1）を用いる。

8. **附図** 附図は1頁大の図版で（Plate）とし，なるべく篇末に入れる。原図が写真であつても本文中に組込む時は Fig. にする。附図の番号はローマ数字（Ⅰ，Ⅱ）を用いる。

9. **生物名** 邦文ではカタカナの和名の次に，学名を *Italic*（命名者名は Roman で頭文字を Capital，後を Small Cap.）で入れ，英文では俗名の次に学名を邦文と同様に入れる。〔その間は（,）で切る〕これを原則とするが論文により必要がなければ一部又は全部の学名，俗名を略してもよい。学名は（ ）で囲まない事。

10. **化学名** 邦文中の外来語の化学名は一般的なものはカタカナを用い，英字を用いねばならない時は Small で入れる。

11. **人名** まぎれない時は姓のみを記し名と敬称とを省いてもよい。欧名でも姓のみで頭文字は後は Capital，後は Small capital で書く。

12. **単位及び記号** 単位を表わす文字は英文中では（C.，cc.，m*l*.，kg.，m.）の如く（.）をつける。但し（Ω, μ, γ, N, M, pH，及び方位の N, S, E, W）には（.）をつけない。邦文中ではこれらの（.）はすべて省く。量を代表する記号は（長さ *l*，高さ *h*）の如く *Italic* にする。

13. **邦文本文中の外国語**（横文字の場合）は人名，地名，ドイツ語の名詞等を除き Small で入れる。同一邦文中で同一物名の和洋語の混用はさける。

14. **文献** 本文中の関連個所にうわつきで一貫番号をつけ一括して末尾に集める。番号はアラビア数字（1,2,3）を用い片カッコ（1），パーレン）で囲み各行の末尾にピリオド（.）をつける。著者名は姓と名とを書き著者名の後はコロン（：）で切る。雑誌名の略し方は慣用法に従う。日本水産学会誌のことは本誌とする。英文雑誌名は *Italic* で書く。雑誌の巻番号は **Gothic** にする。西歴年号は必ず入れる。文献の見出しは（文献，References）とする。同一著者名，同一雑誌名を連記する時は（——）で略してもよい。
文献の書き方について著者の都合で上の指定によらない時は特にその事を付記しておく事。

15. **脚註** 脚註は数字でない記号（*，**）を用い関係頁の下段に入れ巻末に集めない。

Ca^{45} によるアコヤガイ *Pinctada martensii* (DUNKER) 稚貝の貝殻形成に関する研究—海水及び餌料よりの摂取の比較*

渡部哲光・吉井義一・岡田弥一郎
(三重県立大学水産学部)

Studies of Shell Formation in Young Pearl Oyster, *Pinctada martensii* (DUNKER), Using Ca^{45}—Comparison of the Uptake of Ca^{45} from Sea Water and Food.

Norimitsu WATABE, Giichi YOSHII and Yaichiro OKADA
(*Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie*)

The authors compared the uptake of Ca^{45} in the bodies of youg pearl oyster, *Pinctada martensii* (DUNKER), from filtered and unfiltered (ppt. volume of plankton and other floating materials was 2.6 c.c./*l*.) sea water, to each of which Ca^{45} had been added to show the radioactivity of 4000 cpm/c.c..

After the radioactivity of the plankton reached maximum (Fig. 1), pearl oysters were put into each group of the sea water and reared for periods from 2 to 72 hours. Radioactivity in the mantle, gill, other organs and shell are shown in Table 1 and Figures 2 to 5. Larger amount of Ca^{45} was incorporated in the oysters reared in the plankton sea water than in those reared in the filtered one. The difference was larger in the mantle than in the gill. By those results gills are considered as the principal organ for the uptake of Ca from sea water, and Ca taken up from plankton through digestive organs seem to be transported to gills in low degree. The amount of Ca^{45} deposited in the shell reared in the plankton sea water was twice as those in the filtered one, despite that the activity of Ca^{45} in the plankton was one-hundredth of that of the sea water. That means that Ca are taken up by the oyster in much higher degree from plankton or other floating materials than from sea water.

Ca^{45} を用いた貝殻形成の研究は，三重水試[1]，松井等[2]，WILBURD & JODREY[3]，JODREY[4]，辻井等[5]，堀口等[6] 及び田中等[7] によつて行われ，その何れも環境水からの Ca の摂取器官が外套膜及び鰓であり，又，外套膜はその主要な排出器官でもあることを報告している。田中等[7] は又，アコヤガイ貝殻に沈着する Ca の量を計算し，この量が海水中の Ca で充分に供給されると述べている。然し以上の研究は，何れも環境水から直接貝に移行する Ca に関するもので，これとプランクトン等の餌料を通じての量とを比較したものは未だ報告がない。海水中プランクトンには，特殊の種に属するものを除き，それに含有される Ca の量は僅少であつて，その利用の効率が海水中の Ca の場合と同程度であれば，貝殻形成に関与する量は殆ど無視し得る。然し，プランクトン量の多い環境にあつては，貝殻の成長は旺盛であり，これは勿論，餌料摂取によつて貝体の成長が大となり，必然的に貝殻形成能力が増大するためであろうが，一方，この僅少な Ca を消化管を通じて高濃度に摂取し，貝殻に沈着させることも考えられる。

筆者らは，アコヤガイの貝殻形成に関し，プランクトン等の餌料に含まれる Ca の演ずる役割について，実験の比較的容易な稚貝を用いて研究した。ここにその結果を報告する。

1957 年1月 14 日受理
* 本研究の費用の一部は昭和 31 年度文部省科学研究費（綜合研究）による。

I 実験材料及び方法

1. 試料貝としては 1956 年 9 月頃，三重県英虞湾にて採苗後養殖中のアコヤガイ *Pinctada martensii* (DUNKER) のうち，殻長約 2 cm のものを使用した。特に稚貝を撰んだのは，(1) WILBURD & JODREY[3]，三重水試[1] の報告の如く，Ca の沈着量は貝殻の部分及び左右両殻によつて異るため，貝殻の限られた部分の測定では貝殻全体への沈着量を推測し難い。然るに稚貝では，貝殻全量が両殻合せて 1〜2 g. で全量灰化が容易であり，従つて測定に便である。(2) 飼育海水が少量で足り，その交換も容易である等の理由による。

2. 実験は室内の貝の衰弱することの少い秋季 10 月に行つたが，英虞湾では秋季のプランクトン量は夏季の約 1/2〜1/10 で非常に少いため，ネツトで集めたプランクトンを通常海水に加え，大体夏季に近い量とした（沈澱量 2.6 c.c./*l.*）。この海水中に Ca^{45} を加え，海水 1 c.c. の count を 4000 cpm. とした。次に，一定時間毎にこの海水 10 c.c. を取り，フオルマリン固定後回転遠心分離し，上澄 及び 沈澱 の count を測定した。その結果，Ca^{45} の沈澱物への移行が 10 時間で平衡に達したので，最初から 24 時間目に，前記稚貝をこの海水（以下プランクトン海水と記す）に入れ，2，5，8，24，72 時間後に 4 個体宛取出し，外套膜，鰓，その他の器官及び貝殻に分け良く水洗後乾燥し，重量を測定した。これを灰化して，その全量（貝殻は灰分約 5 mg）の放射能を科研 32 型 G.M. counter で測定した。又，同時に炉過海水に Ca^{45} を加えて 4000 cpm./c.c. とし，これに稚貝を入れ，前記同様の操作によつて各部への沈着量を測定した。なお，飼育海水は実験中何れも 20 ± 2°C に保ち，比重 $\sigma^{15°}=1.023$ であつた。

II 実験結果及び考察

1. 海水中の Ca^{45} のプランクトンへの転移

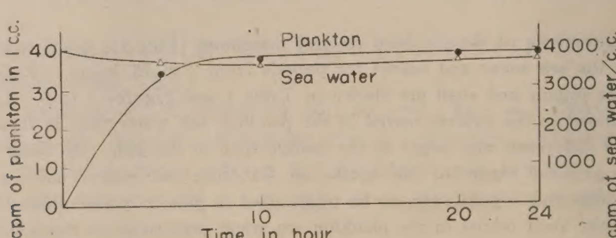


Fig. 1. Uptake of Ca^{45} in plankton and sea water

海水（Ca^{45} の count は 4000 cpm./c.c.）1 c.c. 当りのプランクトンに Ca^{45} の転移した状態は Fig. 1 に示す通りで，10 時間で平衡に達した。その時の放射能は 38 cpm. で，海水のそれは 3960 cpm. であつた。なお実際は，遠心沈澱物にはプランクトンのみでなく，その他の浮游物質も含まれて居り，これらにも Ca^{45} が吸着することは当然であるが，アコヤガイ等は餌料の質的撰択性が殆どなく，たゞ大いさのみを撰択し得る。従つてプランクトンは勿論，その他の浮游物も適当の大いさであれば消化官に入り得る。それ故，ここではこれら沈澱物を一括してプランクトンと呼ぶこととする。

2. アコヤガイへの Ca^{45} の転移

II 1 で示した通り，プランクトンに移行する Ca^{45} は 10 時間で飽和量に達する。24 時間後にこのプランクトン海水中で飼育した稚貝の外套膜，鰓，その他の諸器官及び貝殻に移行した Ca^{45} の count 数，並びに炉過海水飼育のものの夫々は，Table 1 に示す通りである。測定は何れも 4 個体に就いて行い，表にはその平均値を示してある。又，堀口等[6] の述べた如く，新鮮物は水分含有量が変化し易く，又，灰分は培養時間によつて含有が変化し，更に稚貝では全量灰化によつても灰分量が僅少で，秤量誤差を生じ易い。そのため灰化物の count 数を，乾物量 100 mg に換算して表わした。

先づ，貝殻以外の内蔵部について Ca^{45} の移行沈着を見ると，Fig. 2〜4 に示す通り，大体各部とも 2 乃至 8 時間で最大となり，その後稍々減少し，24 時間或いはそれ以後に平衡に達するようである。外套膜，鰓は他の各部よりも常に移行量が大で，これらの結果は田中等[7]，堀口等[6] のアコヤガイ，イケチョウガイにおける結果とよく一致し，これら及び WILBURD & JODREY[3]，JODREY[4] の述べる如く，鰓，外套膜が Ca の吸

Table 1. Radioactivities of each organ of young *Pinctada martensii* reared in filtered, and plankton sea water, both of which containing Ca^{45} (4000 cpm./c.c.). The radioactivities are shown in cpm./100 mg. dry matter (average value of 4 individuals).

Sea water	Organs	2 hr.	5 hr.	8 hr.	24 hr.	72 hr.
Plankton sea water	Mantle	38×100	34×100	63×100	46×100	37×100
	Gill	22×100	36×100	17×100	33×100	30×100
	Other organs	24×100	26×100	19×100	20×100	19×100
	Shells	1.0×100	1.0×100	2.0×100	4.7×100	24×100
Filtered sea water	Mantle	35×100	33×100	38×100	23×100	29×100
	Gill	26×100	13×100	24×100	27×100	35×100
	Other organs	13×100	14×100	11×100	13×100	19×100
	Shells	0.5×100	0.4×100	1.6×100	2.4×100	12×100

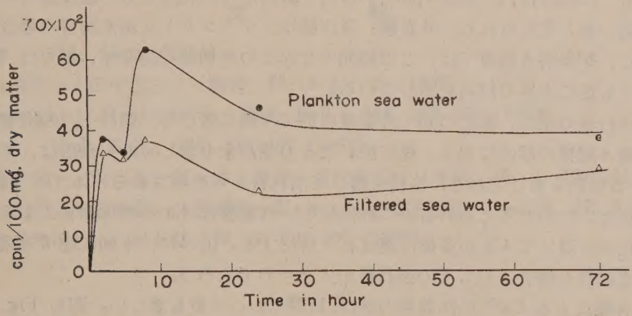


Fig. 2. Uptake of Ca^{45} in the mantles of young *Pinctada martensii* reared in filtered, and plankton sea water.

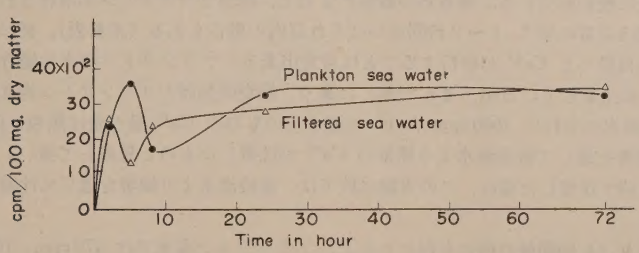


Fig. 3. Uptake of Ca^{45} in the gills of young *Pinctada martensii* reared in filtered, and plankton sea water.

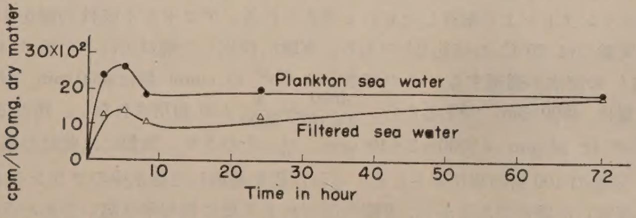


Fig. 4. Uptake of Ca^{45} in the other organs of young *Pinctada martensii* reared in filtered, and plankton sea water.

収，排出器官であることが推定される。

ここで，プランクトン海水で飼育した場合と，炉過海水での場合とを比較すると，前者の方が Ca^{45} の移

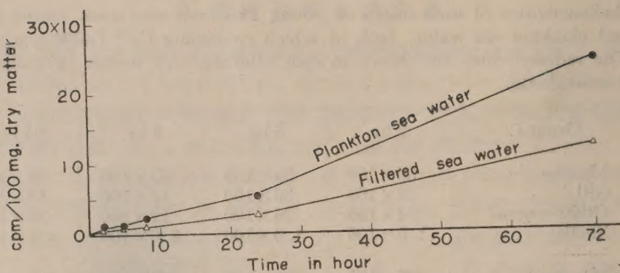


Fig. 5. Uptake of Ca^{45} in the shells of young *Pinctada martensii* in filtered, and plankton sea water.

行量が遙かに多く，特に外套膜ではそれが著しい。これは後述貝殻に就いて説明するが，環境水中の初期の量が等しい場合でも（両者何れも 4000 cpm./c.c.），餌料からの利用の方が直接鰓等から移行するよりも遙かにその効率が高い為と考えられる。外套膜，及び鰓は，プランクトン海水飼育の場合は 24 時間で平衡に達している。然し，炉過海水飼育では，この時間でなおこの平衡量に達せず，鰓では 72 時間を要し，外套膜では 72 時間でも更に上昇の傾向を示している。

飼育海水による移行量の差は，前記の如く外套膜に於ては特に著しく，鰓はそれ程顕著ではない。その他の器官は外套膜と略々同様の傾向にある。鰓に於いてその差が余り著しくない理由は，この器官は直接海水から Ca を摂取する役割を果しており，餌料を通じて消化官から吸収される Ca は，前者に比較すると鰓にそれ程多く運ばれないためと考えられる。これに反し，外套膜は Ca の摂取器官であると同時に，排出の器官で，鰓及び消化官を通じて Ca が多量に運ばれて排出する。従つて，平衡に達する迄は，プランクトン海水の方が炉過海水飼育の場合よりもその移行量が大きいのであろう。

プランクトンの有無による Ca^{45} の沈着量の差は,貝殻において最も著しい。即ち Fig. 5 に示す通り,何れの場合においても，飼育開始後 2 時間で貝殻に沈着し，時間とともにその量は増大しているが，両者の差は 2 時間にして既に現われている。筆者らの観察によると，餌料プランクトンが消化され，糞として肛門より排泄される時間は非常に早く，1〜2 時間或いはそれ以内の場合もある（未発表)。従つて，飼育後 2 時間で餌料→消化管→貝殻へと Ca^{45} が移行することは肯定出来る。プランクトン海水の場合は，炉過海水での約 2 倍量の Ca^{45} が沈着しているが，Ⅱ1 で示した通り，飼育開始時のプランクトン海水中の Ca^{45} は 3960 cpm./c.c.，炉過海水のそれは 4000 cpm./c.c. で海水そのものの Ca^{45} 量の差は無視し得る。従つて,貝殻には両者とも，鰓等を通じて直接海水より同量の Ca^{45} が沈着したものと見做して良い。それ故，プランクトンより消化管を経て沈着した量は，この実験に於ては，直接海水より鰓等を通じて沈着した量と略々等しいと考えられる。

今，飼育開始より 24 時間後の場合を例にとると，プランクトン海水では 470 cpm./100 mg.，濾過海水では 240 cpm./100 mg. の Ca^{45} が貝殻に沈着している。比較のため，貝殻重量を何れも 2 g. とすると(実際は 2.301 g.，1.976 g.）貝殻全体で夫々 9400 cpm.，4800 cpm. が沈着したこととなる。従つて，両者の差 4600 cpm. はプランクトンより転移したものと考えられる。アコヤガイ成貝の鰓を 1 時間に通過する海水の量は，筆者の実験では 20°C の時約 2 l である。実験に使用した稚貝ではその約 1/10 と考えられるから，24 時間に約 5 l の海水が通過する。この海水中の Ca^{45} の count 数は $4000\ cpm. \times 5000 = 2\times10^7\ cpm.$ で，貝殻への沈着量は 4800 cpm. であるから，$\frac{4800}{2\times10^7} \fallingdotseq \frac{1}{5000}$ しか利用されない。所が 5l の この海水中のプランクトンの Ca^{45} は $38\ cpm. \times 5000 \fallingdotseq 2\times10^5\ cpm.$ で，そのうち，貝殻には前記の通り 4600 cpm.，従つて $\frac{4600}{2\times10^5} \fallingdotseq \frac{1}{50}$，前者の 100 倍の利用率となる。これは鰓を通過した海水中のプランクトン等がすべて消化管に運ばれたと仮定した場合であるから，実際にはこれより更に利用率は高いであろう。田中等[7] の実験では，プランクトン及び海水中の Ca 比が約 $1:5\times10^4$ で，これは特に Ca 含有量の少い時期であつたと述べており，この程度であれば，プランクトンを通じて貝殻に沈着する Ca 量は無視し得るかも知れないが，通常の場合はプランクトン中の Ca が海水に比し僅少であつても，その利用率は遙かに大きいので，貝殻形成に関与する量は無視し得ないと考えられる。

要　　約

1. アコヤガイ稚貝（殻高約 2 cm.）を用いて海水及びプランクトンから Ca^{45} が貝体，貝殻に沈着する状態を比較した。

2. プランクトン海水，及び炉過海水で飼育した場合，飼育 2 時間で貝体各部に Ca^{45} が移行する。そして，何れも外套膜，鰓に多い。平衡に達する時間は炉過海水の方が長い。

3. プランクトン海水の場合は，貝体，貝殻共に Ca^{45} の移行量が多く，特に外套膜では著しい。鰓はそれ程両者間の差がない。これは鰓が直接海水より Ca を吸収する器官である事を示すものと考えられる。

4. プランクトンに移行した Ca^{45} は海水中の Ca^{45} より遙かに少い。然し，一定量の海水中のプランクトンから Ca^{45} が，貝の消化管を通じて貝殻に沈着する率は，同量の海水の Ca^{45} が直接鰓等を通じて貝殻に沈着する率よりも遙かに大きい。従つて，プランクトン中の Ca 含有量が海水に比し僅少であつても，貝殻形成に関与する量は一般に無視し得ないものと考えられる。

文　　献

1) 三重水試時報： **169**, 18–29 (1952).

2) 松井佳一・内田洋一・田中正三： 動雑, **61**, 3–4, 119 (1952).

3) K. M. WILBUR and L. H. JODREY： Biol. Bull., **103**, 269–273 (1952).

4) L. H. JODREY： Biol. Bull., **104**, 389–407 (1953).

5) 辻井　禎・吉井義一・岡田弥一郎・井上義雄・宮村光武： 本誌, **20**, 2, 107–111 (1954).

6) 堀口吉重・三宅正人・吉井義一・岡田弥一郎・井上義雄・宮村光武： 本誌, **20**, 2, 101–106 (1954).

7) 田中正三・波多野博行： 日化誌, **72**, 6, 602–605 (1955).

硬骨魚類の副腎系に関する研究—II.
硬骨魚類15種の副腎組織の比較

小栗幹郎・日比谷 京
(東京大学農学部)

Studies on the Adrenal Gland of Teleosts—II.
On the Adrenal Tissues in 15 Species of Fishes

Mikio OGURI and Takashi HIBIYA

The histological observations were made on the acidophil cells and the chromaffin cells in the head kidneys and on the Stannius bodies of 15 species of teleosts (see Table 1).

Surrounding the cardinal veins and its branches in the head kidneys, the acidophil cells are found as densely packed cell groups or as irregular cell cords. On the other hand, the chromaffin cells appear in the walls of cardinal veins and its branches, and sometimes scattering in the acidophil cell groups.

The acidophil cells are stained deeply with eosin and contain relatively large round or oval nucleus, in which a well defined nucleus and a small number of chromatin are found. The chromaffin cells are stained faintly with eosin. The nuclei of chromaffin cells are oval or irregular in shape and are larger than those of acidophil cells.

Concerning the arrangement of the acidophil cells and of the chromaffin cells, six types of their distribution are distinguished (Fig. 3). In *Anguilla japonica*, neither of them exist in the head kidney, but both cells are confined within the wall of sinous vein near the head kidney (Fig. 3—VI).

The histological structures of the Stannius bodies do not exhibit any wide variation throughout the different species of teleosts. The cells of Stannius bodies contain many siderophil granules, which are stained well with iron-hematoxylin, azocarmine, ponceau 2 R or eosin. Moreover, these granules are PAS-positive, but contain no lipids. These features indicate the condition of active secretion of these cells.

緒　言

前報[1]で，3種の硬骨魚について，哺乳類の副腎髄質に相同の組織と考えられるクローム親和細胞群が腎臓頭腎部内の血管壁に存在すること，また哺乳類の副腎皮質と相同の組織と考えられている頭腎内酸好性細胞群および Stannius 体がそれぞれ副腎皮質と組織学的にかなり著しい相違のあることを報告した。

著者等は更に，前報の3種を含む日本産硬骨魚 15 種について，クローム親和細胞および酸好性細胞の形態，分布状態等について研究し，その分布型の分類を試み，あわせて Stannius 体につき組織学的観察を行つて 2, 3 の新知見を得たので報告する。

本研究にあたり，材料採集の便宜を図られた東大農学部安田富士郎氏，同佐伯有常助教授，ならびに淡水区水産研究所白石芳一技官に心からお礼を申上げる。

材料および方法

供試材料としては Table 1 に示されているように，7種の淡水魚と8種の海産魚，合計 15 種類の硬骨魚を用いた。

1957 年 3 月 16日受理

頭腎部および Stannius 体は Zenker-Formol 液，Bouin 氏液，中性ホルマリン水，或は Susa 液により固定パラフイン切片又は凍結切片として，染色は Mayer 氏酸性ヘマラウン・エオシン染色を主とし，その他 Heidenhain 氏鉄ヘマトキシリン染色，Azan 染色，Held 氏モリブデン酸ヘマトキシリン染色，Masson 氏三重染色等を施した。又 Stannius 体については PAS 反応（多糖類染色），Sudan Ⅲ染色および Sudan black B 染色等の組織化学的方法を併用した。

観察結果および考察

研究に用いた 15 種の腎臓の外部形態は Fig. 1* に示す通りであるが，同一種の中でも，年令，体長等の違いにより，ある程度の個体差が認められた。頭腎部の形態も魚種により著しい差異を示し，特にウナギ，ドジョウでは頭腎部の肉眼的判別が困難であつた。

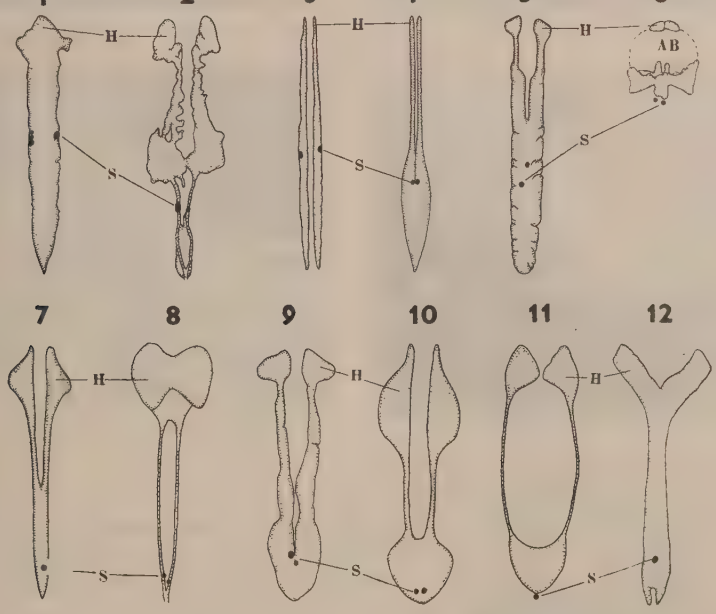


Fig. 1. Ventral views of the kidneys* of 12 species of fishes, showing especially situation of the head kidneys and the Stannius bodies.

1 : *Salmo gairdnerii irideus*. 2 : *Cyprinus carpio*, 3 : *Misgurnus anguillicaudatus*, 4 : *Anguilla japonica*, 5 : *Channa argus*, 6 : *Plotosus anguillaris*, 7 : *Niphon spinosus*, 8 : *Prionurus microlepidotus*, 9 : *Pterois lunulata*, 10 : *Lepidotrigla microptera*, 11 : *Hoplobrotula armata*, 12 : *Paralichthys olivaceus*.

H, Head kidneys; S, Stannius body; AB, Air-bladder.

* The kidneys of other three species are illustrated in previous paper.

発生学的には魚類の頭腎部は前腎で，中腎が機能をいとなむようになると，細尿管，糸球体の退化消滅にともない，ほとんどリンパ様組織に置換えられてしまうということは，古くから BALFOUR[2] その他の研究者によつて報告されているが，魚種によつて退化の程度が異なり，著者等の観察した魚種の中，頭腎が完全にリンパ様組織になつているものはニジマス，ナマズ，フナ，コイ，ドジョウ，ウナギ，カムルチー，ゴンズイ，ヨロイイタチウオ，ヒラメの 10 種で，頭腎内に細尿管が少数認められるものにアラ，アイナメ，カナ

* ナマズ，フナ，アイナメの 3 種については前報[1] 参照。

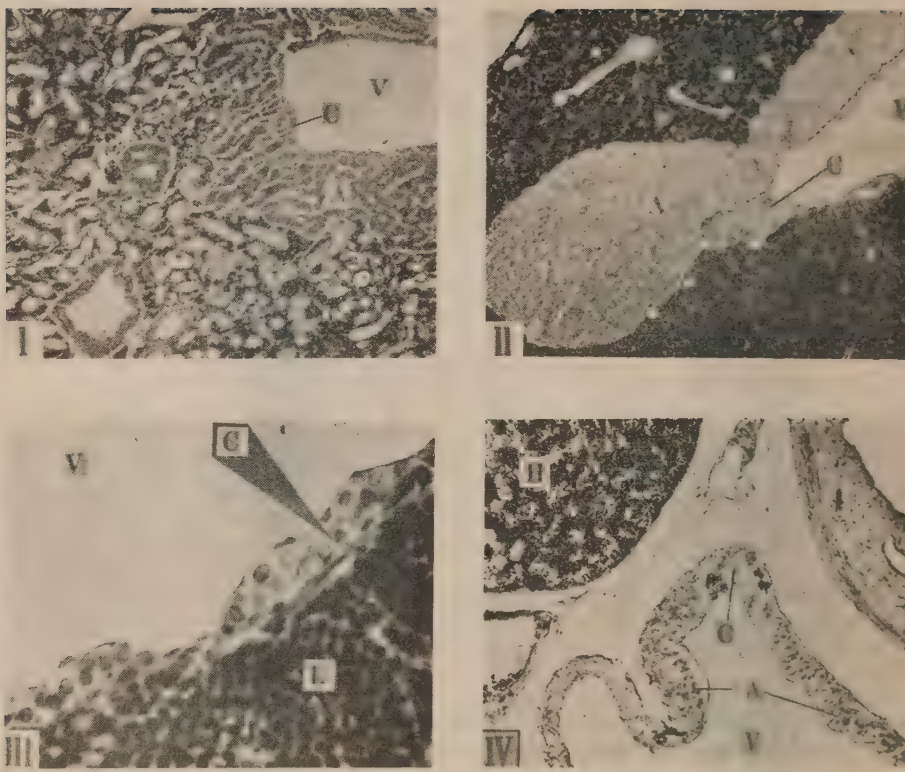


Fig. 2.

Ⅰ : Head kidney of *Pterois lunulata*. ×36

Ⅱ : Head kidney of *Niphon spinosus*. ×36

Ⅲ : Chromaffin cells projecting in the cardinal vein of the head kidney in *Salmo gairdnerii irideus*. ×380

Ⅳ : Chromaffin cells and acidophil cells in the wall of the sinous vein near the head kidney in *Anguilla japonica*. ×90

C, Chromaffin cells; A, Acidophil cells; H, Head kidney; L, Lymphoid tissue; R, Renal tissue of the head kidney; V, Cardinal vein or its branch.

ウナギの3種であり、残りのニサダイ，ミノカサゴの2種は腎臓本来の組織構造を示していた (Fig. 2-Ⅰ)。

クローム親和細胞と酸好性細胞

ウナギを除いた他のすべての魚類の頭腎内には，前報で報告したクローム親和細胞と酸好性細胞とが存在することが確認された。

クローム親和細胞の形態： 本細胞は頭腎内主静脈およびその分岐静脈壁に存在し，或は後述の酸好性細胞群間に散在するが，また頭腎部附近の交感神経節中に集団をなして存在する場合もウナギで認められた。細胞質は Zenker Formal 液で固定すると，クローム親和反応陽性で，黄褐色の微細顆粒でみたされるが，それ以外の固定液による固定の Mayer 氏酸性ヘマラウン・エオシン染色標本では，細胞質はエオシンでほとんど染まらず，むしろわずかに塩基好性である。細胞の核は楕円形或はやや不規則な形のものが多く，Chromatin に乏しく，核小体も不明瞭な場合が多い。また2核をもったクローム親和細胞も稀に見出される。なおクローム親和細胞の核は，一般に酸好性細胞の核より大きく，この点 BAECKER[3] の所見と反対である。

酸好性細胞の形態： 本細胞は頭腎内主静脈およびその分岐静脈周囲に存在する。核は円形又は楕円形でその大きさは一般に淡水魚の方が海産魚より大きい。Chromatin は少く，核仁は一個明瞭に認められる。細

胞質は酸性色素で一様に染まり，Held 氏モリブデン酸ヘマトキシリンで黒色顆粒状に染まる。空胞は認められない。更にニザダイ，ミノカサゴ，ヒラメでは，細胞質中に微細黄褐色顆粒が少量存在する。なお本細胞については，組織化学的に検討しつつあり，その詳細は次の機会に発表する予定である。

分布型： クローム親和細胞と酸好性細胞の分布状態に関しては，魚種によつてかなりの相違が認められる。著者等はその分類を試み，次の6種の分布型を設定した（Table 1）。

Table 1. Histological structure of the head kidney and the types of distribution of the chromaffin cells and the acidophil cells in it.

Species	Histological structure of the head kidney	The type of distribution of the chromaffin cells and the acidophil cells
Salmo gairdnerii irideus (Nijimasu)	L T	III
Parasilurus asotus (Namazu)	L T	II
Carassius auratus (Funa)	L T	I
Cyprinus carpio (Koi)	L T	I
Misgurnus anguillicaudatus (Dojo)	L T	I
Anguilla japonica (Unagi)	L T	VI
Channa argus (Kamuruchi)	L T	I
Plotosus anguillaris (Gonzui)	L T	I
Niphon spinosus (Ara)	L T*	II
Prionurus microlepidotus (Nizadai)	R T	IV
Pterois lunulata (Minokasago)	R T	II
Hexagrammos otakii (Ainame)	L T*	IV
Lepidotrigla microptera (Kanagashira)	L T*	II
Hoplobrotula armata (Yoroiitachiuo)	L T	II
Paralichthys olivaceus (Hirame)	L T	V

L T, Lymphoid tissue; R T, Renal tissue; L T*, Lymphoid tissue containing uriniferous tubules.

第I型： 頭腎内主静脈および分岐小静脈を取囲んで存在する酸好性細胞群の間に1～数個ずつクローム親和細胞が散在して分布する型で，前報のフナの他に，コイ，ドジョウ，カムルチー，ゴンズイがこれに属する（Fig. 3-1）。

第II型： クローム親和細胞が頭腎内主静脈およびその分岐静脈の血管壁に介在し，酸好性細胞群がこの血管を包囲している型で，これに属するものとして，ナマズ，アラ，ミノカサゴ，カナガシラおよびヨロイイタチウオがあげられる（Fig. 2-I，II，Fig. 3-2）。

第III型： ニジマスで認められた型で，両細胞群は決して相接することなく，別々に頭腎内に存在する（Fig. 3-3）。クローム親和細胞群は頭腎内静脈壁に現れるが，酸好性細胞群ほどよく発達せず，細胞層は2～3層をなし，そのあるものは小細胞群として，血管腔に突出している（Fig. 2-III）。

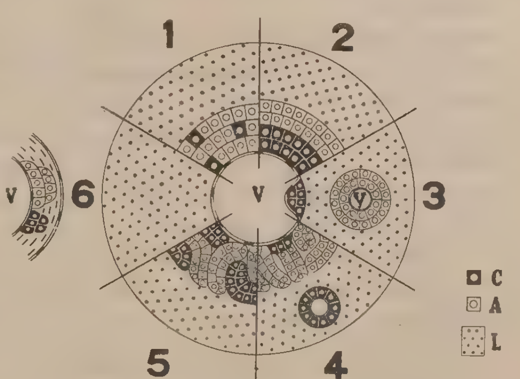


Fig. 3. Diagrammatic figure showing the 6 types on the distribution of the chromaffin cells and the acidophil cells in the head kidney.

A, Acidophil cells; C, Chromaffin cells, L, Lymphoid tissue of head kidney; V, Cardinal vein or its branch.
1, Type I; 2, Type II; 3, Type III; 4, Type IV; 5, Type V; 6, Type VI;

第IV型： ニザダイ，アイナメが本型に属し，クローム親和細胞の大多数のものが第III型におけると同様に，酸好性細胞群とは独立して頭腎内静脈壁に分布しているが，なお若干のものが小細胞群として酸好性細胞群間に散在する（Fig. 3-4）。

第V型： 本型はヒラメで見出された型で，酸好性細胞もクローム親和細胞もそれぞれ索状配列を示し，

両細胞索が混在する。なおこれらの間に神経節細胞の存在が観察される場合もある（Fig. 3-5)。

第Ⅵ型： 前述のごとく，ウナギは両細胞とも頭腎内には認められないが，頭腎部附近の肥厚した洞様血管壁に存在することが見出された。即ち，酸好性細胞群が肥厚した洞様血管壁に 2～3 層にわたつて存在し，クローム親和細胞は酸好性細胞の間に散在していたり，これとは独立して小細胞群として存在していたり，或は酸好性細胞群と僅かに結合組織で隔てられて小細胞群として血管腔に突出していたりして，その分布状態は様々である（Fig. 2-Ⅳ，Fig. 3-6)。

さて，著者等が観察した 15 種の硬骨魚については以上の 6 型に分類されたが，BAECKER[3] 等によつて記載されている *Clupea sprattus*、*Squalius cephalus*、*Gobio fluviatilis*、*Rhodeus amarus*、*Gasterosteus aculeatus*，*Acerina schraetzer*，*Cottus gobio* 等は著者等の第Ⅰ型に，また同じく *Salmo fario*、*S. irideus*，*Esox lucius* 等は第Ⅲ型に属するものと考えられ，ニジマスについては著者等も一致した所見を得た。同種において観察されたクローム親和細胞が小細胞群として血管腔内に突出して存在する場合は，KRAUSE[4] 等によつて報告されている円口類のそれと酷似していて，一応注意すべき所見である。

ヒラメで見られた第Ⅴ型は，著者等によつて見出された型であるが，MÜLLER[5] その他によつて報告されているドバトなど，鳥類の副腎における間腎細胞および上腎細胞の配列状態に類似していて，これも比較組織学上興味ある所見と考えられる。

日本産ウナギ *Anguilla japonica* では，クローム親和細胞および酸好性細胞の分布状態は他の魚種の場合と違つて頭腎内に見出されず，第Ⅵ型として区別されることは先に述べた通りである。しかし，VINCENT 等[6] によれば，ヨーロツパ産ウナギ *A. anguilla* では両細胞が頭腎内に存在し，*A. japonica* の場合と異つている。

上述の観察結果のうち，特に注目に値する点は第Ⅱ，Ⅲ，Ⅳおよび第Ⅵ型に見られるように，クローム親和細胞が静脈壁の中に介在することである。しかもそれはかなり多くの魚種に広く見られ，少数の例にとどまらない。このように，副腎髄質或は上腎組織が血管壁の中に存在する例は，円口類を除いては，まだ報告されていない。

Stannius 体

Stannius 体は淡黄白色の小体で，その解剖学的な位置（Fig. 1)，大きさには同一魚種においてもかなりの個体差が認められるが，その組織学的所見は観察した 15 種の硬骨魚についてほぼ同様であつた。即ち，Stannius 体実質は周囲を結合組織よりなる被膜で包まれ，多数の小葉よりなる。小葉を形成している細胞の核は円形，楕円形，その他やや不規則な形状を示し，Chromatin は少い。ナマズ以外の魚種では，細胞質中に微細顆粒状（ドジョウ，アイナメ，ヒラメ等），或は粗大顆粒状（ニジマス，フナ、ドジョウ等）の Siderophil granules が多数認められた。本顆粒は Zenker-Formol 液或は中性ホルマリン水で最もよく固定される。又本顆粒は Heidenhain 氏鉄ヘマトキシリンによく染まる外，Held 氏モリブデン酸ヘマトキシリン，エオシン，Azocarmine (Azan 染色)，Ponceau 2 R (Masson 三重染色) 等により可染する。一方 Sudan Ⅲ および Sudan black B 染色を行つたが，結果は陰性であり，したがつて脂質の存在は考えられないが，PAS 反応は陽性であり，多糖類を含むものと思われる。

要　　約

1. 日本産硬骨魚類 15 種について，クローム親和細胞と酸好性細胞との形態，分布状態を組織学的に比較観察し，Fig. 3 に模式的に示した 6 種の分布型を設定した。

2. これらの分布型について述べ考察を加えたが，特に第Ⅴ，第Ⅵ型は著者等によつて見出された新しい分布型である。

3. クローム親和細胞が血管壁の中に介在し（第Ⅱ，Ⅲ，Ⅳおよび第Ⅵ型），または血管壁内面から血管腔へ突出して存在すること（第Ⅲ型）は注目に値する。

4. 硬骨魚類 15 種の Stannius 体はほぼ同じ組織構造を示し，その細胞内顆粒は PAS 反応陽性で，各種染色法でよく染め出されるが，脂質は含まれないことを明らかにした。

文　　献

1) 小栗幹郎・日比谷　京： 本誌 22, 621—625 (1957).
2) Balfour, F.M. : *Quart. J. micro. Sci.*, **22**, 12—16 (1882).
3) Baecker, R. : *Z. mikros.-anat. Forsch.*, **15**, 204-273 (1928).
4) Krause, R. : "Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere" Walter de Gruyter & Co., Berlin u. Leipzig (1923), S. 858.
5) Müller, J. : *Z. mikros.-anat. Forsch.*, **17**, 303-352 (1929).
6) Vincent, S. & A. Curtis. : *J. Anat.*, **62**, 110-114 (1927).

振縄（桂縄）の駆集効果に就いて

今村　豊・小倉　通男
（東京水産大学）

Study on the effects of the fish-gathering by means of Furinawa.

Yutaka IMAMURA and Michio OGURA

In the Inland sea of Japan it has been the practice of catching *Pagrosomus major* (T. &S.) to use Sibariami (a type of purse seine). In this method of fishing, the fishes are first driven by means of Furinawa into a pack which is then enclosed with the fishing-net so as to be readily landed. (Fig. 1)

In the present work some model experiments were carried out so that the influence of Furinawa exerted on the behavior of fishes might be analysed.

The scheme of model Furinawa here used is given in Fig. 3. The model fishes were ordinary carps, *Cyprinus carpio* LINEE. The experiments were performed in a water tank as shown in Fig. 2.

Experiment 1. It was investigated the effects of rise and fall of illumination brought on the rate of fish-gathering.

Experiment 2. It was examined the relation between the towing speed of Furinawa and the rate of fish-gathering.

Experiment 3. It was inquired into the bearing of number of Furiki attached to Furinawa upon the rate of fish-gathering.

The results are shown in table 1—11. On the basis of these data it may well be said that:

1. The rate of fish-gathering remains 0 % when Furinawa used without any Furiki.
2. Treating the data statistically for the rate of fish-gathering in correlation to the strength of illumination, a value for the correlation coefficient is calculated as $r=+0.5$, in an illumination range of 10〜150 Lux. In this range the rate attains to 91〜96 %. In an illumination range of 0〜10 Lux, $r=+1$ while the gathering-rate effected by Furinawa remains only about 40 %, thus, the efficiency of Furinawa depends upon the illumination, which has in turn to be of a sufficient Lux for the fishes to see Furiki.
3. The rate of fish-gathering under the influence of Furinawa varies with the towing-speed of the latter. Namely, the variation of the rate changes with the inclination of Furiki, which is in turn determined by the towing-speed.
4. As Furiki increases in number also increases the rate of fish-gathering.

緒　　論

瀬戸内海においては，マダイ *Pagrosomus major* (T. & S.) を漁獲するのに縛網 (Shibari-ami) を使用している。これにあわせて用いられる振縄 (Furi-nawa)，別名，桂縄 (Katsura-nawa) について，漁業者の説明によると，振木 (Furiki) がふれあつて発する音と，振木の材料として使われた槇 (Maki) の白色によつて魚をおどす効果があると語つている。

檜山[1]によれば，振縄の効果は，魚の視覚及び側線の感覚による広い意味の聴覚の作用によると説明している。之等から振縄の駆集効果は魚の視覚・聴覚に関係がある様に推定される。著者らは振縄について模型実験を計画し，その駆集効果及び魚の視覚，聴覚との関係について調べた。（1）水中照度を[illegible]

1957 年 4 月 6 日受理

"シバリ網"は産卵期の 2〜5 年魚の群泳するマダイを主目的とし，サワラ *Scomberomorus Niphonius*，マアジ *Trachurus Japonicus* (T. & S.) を漁獲する。その漁場は播磨灘に於ては，水深 10〜30 m，底質砂泥の処を選び操業する。
漁期は 4〜6 月である。

（2）振縄の曳行速度と駆集率の関係（3）振縄の振木の数と駆集率の関係（4）振縄に包囲された魚の生態，此等各項目に就いて実験考察したもので以下その結果を報告する。

実験装置及び方法

実験水槽，長さ 6 m，巾 3 m，深さ 1.5 m のコンクリート水槽を使つた。その水深を 45 cm とした。照明，室内を暗くし，200 V 300 W の白色灯２ケを Fig 2 の如き位置に配し，水面から 2.41 m の高さに固定した。照度の変化はスライダックを使つて水中照度 0〜150 Lux の範囲で実験を行つた。振縄，模型の作成については，実用の振縄の規格が雑多であるため，著者は振木の長さを試魚の平均体長と同じく，振木の巾を試魚の体巾と同じくして作つた。振縄は綿糸 40 番手 60 号を使つた。縄は振木の部と手綱の部に区分され，振木の部の長さ 4.16 m とし手綱の部は片側 4 m とし全長 12.16 m である。振木の部を A と B に区分し，A を 2.16 m（振木の間隔 2.5 cm）B を 1 m（振木間隔 3 cm）とした。即ち模型は Table 1 に示す規格で Fig 3 の如く作成した。沈子として鉛 10 gm を振木の部の両端に各一ケ宛，3.5 gm の沈子を60ケ 1.6 gm の沈子を 60 ケ，振木の部に交互に振木の間に附して，振縄の浮上を防せいだ。

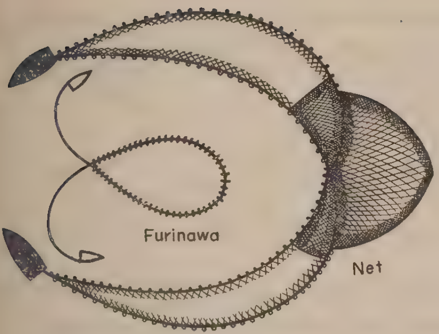
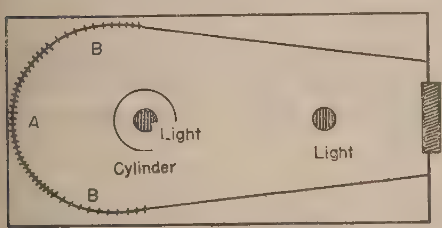


Fig. 1. Opereting view of Furinawa and Sibariami.



Dimension of the concreate water-tank.
Length ...6m. Breadth....3m. Depth....1.5m.

Fig. 2. Towing apparatus of Furinawa.

Table 1. Furinawa's size

Real Furiki (Maki)				Model Furiki (Beniya)			
Body length *Pagrosomus major* (T. & S.)	Length of Furiki	wide & Thick-ness	Body leng-th/Length of Furiki	Body length *Cynrius carpio* LINNE	Length of Furiki	wide & Thick-ness	Body leog-th/Length of Furiki
35 cm	35 cm	(3 cm 0.6 cm	1	6 cm	6 cm	(1 cm 0.1 cm	1

Warp——Manila rope dia 9 mm　　Warp——Cotton yarn dia 2.1 mm.

Model Furinawa.
Furinawa is made partly of furiki (length..4.16 m.) and partly of warp (lenth..one side 4 m.). (Total length 12.16 m). Partly of furiki is made partly A (at intervals of furiki 2.5 cm) and B (at intervals of furiki 3 cm.)...Total number of furiki 167.
Furiki size......The ratio of the body length to length of furiki is as 1.

振縄の曳行距離を 4 m とし，その曳行は Fig 4 の様な捲取方法で行い。実験時の曳行速度を 4〜4^0 cm/sec とした。試魚は体長 4.5〜6 cm のコイ carp (*Cyprinus carpio* LINNE) を使用した。

試魚 50 尾を実験単位とし，振縄内側の中央定点 (Fig 2 参照) に径 35 cm，高さ 64 cm の透明なセルロイド円筒に入れ，5 分間順応させた後，円筒を静かに引揚げ放魚する。放魚後 10 秒にて振縄を各速度に応じて曳行し始める。曳行中，魚の振縄から

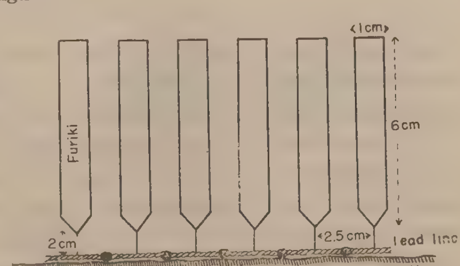


Fig. 3. Description of Furiki.

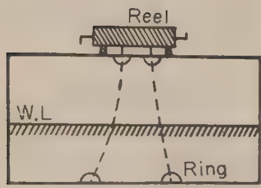


Fig. 4. Apparatus of the towing-reel.

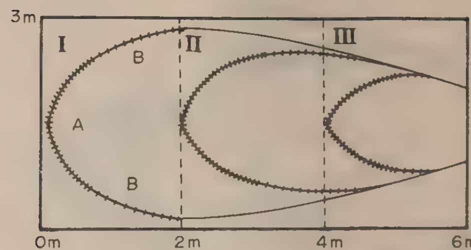


Fig. 5. Section of water tank to observe dispersed fishes from furinawa.

の脱出の状態に就いて観測し，同時に，脱出尾数，脱出時間，(曳行開始後，魚が振縄から外部に脱出するまでの時間）及び脱出部分を（Fig 5 の区分に応じて）観察記録した。水槽内には予め餌料，砂泥等を完全に除去して実験した。実験時の水温は 10°C～12°C，実験時間は午前 10 時～午後6時迄。

実 験 及 び 結 果

予め振木の駆集効果の有無を検する為に,曳索（振縄より 振木を 全部除いたもの）単独の駆集効果を調らべる予備実験を実施した。Table 2 に示す結果に見られる様に駆集率は各照度に於て皆無であつて魚は常に曳索を無視し自由に游泳した。只 Lux に於て駆集率が他に比し増加したのが注目される。駆集率＝(駆集尾数)/(放魚尾数)×100

実験 1. 水中照度と駆集率の関係

実験は前述の方法で実施した。曳行速度は 5 cm/sec に一定した。実験照度は水中（水底に於ける測定）照度 0～150 Lux の範囲とした。振木は振縄の中央部（Aの部）216 cm に対して 101 枚，両端の部（Bの部）100 cm に対して各々 33 枚，総計 167 枚を使用した。

Table 2. The rate of fish-gathering under the influence of illumination, when the Furinawa used without any Furiki.

Illumination (Lux)	Number of gathered fishes	Fish-gathering rate (%)
150	0.7	1.0
75	1.0	2.0
50	0.0	0.0
30	1.0	2.0
10	0.0	0.0
0	6.7	13.4

Towing speed 5 cm/sec.
Experimental data was shown the mean value of 10 times with 50 fishes unit.

$$\text{Fish-gathering rate} = \frac{\text{Gathered fishes by furinawa}}{\text{Total number of testing fishes}} \times 100$$

実験結果を Table 3, 4, 5 に示す。これによれば，照度 10～150 Lux の範囲において駆集率は高く，且つその間に格別の相違はない。照度 10 Lux 以下では駆集率は急激に低下する。而して前者に於ては完全に群行動をとるが，後者においては，魚は常に各個に分散して行動した。次に，振縄からの魚の脱出についてみると，脱出魚の大部分は振木相互の間隙より脱出し，振木の上部を越えて脱出する魚は前者に比し極めて少い。曳行中の時間と脱出魚の関係，魚の振縄からの脱出は，曳行の後半において，即ち振縄のかこむ面積が縮小するにしたがつて，脱出魚の数は著しく増加するのが認められた。Fig 5 に示す区分によれば魚の脱出尾数はⅠ区域（曳行開始より 25 sec まで，振縄面積 8 m^2）Ⅱ区域(曳行開始後 25～50 sec の間，振縄面積 4.8 m^2）Ⅲ区域（曳行開始後 50～75 sec の間，振縄面積 2 m^2）の順に増加した。備考，水中における振木の高さ 8～10 cm．振木から水面まで 35～37 cm．水深 45 cm。

Table 3. The rate of fish gathering under the influence of illumination (Experiment 1.)

Illumination (Lux)	Number of gathered fishes	Standard deviation of gathered fishes	Fish-gathering rate (%)
150	46.8	1.2	94
75	48.1	1.2	96
50	47.2	2.6	94
30	46.3	3.7	93
10	45.5	3.6	91
0	22.1	5.6	44

Towing speed 5 cm/sec.
Experimental data was shown the mean value of 10 times with 50 fishes unit.

Table 4. Dispersive location of fishes from Furinawa under the influence of illumination (Experiment 1.)

dispersed Location		Illumination (Lux)				
		150	75	50	30	10
From intervals of Furiki	2 A	9	6	12	4	17
	2 B	15	4	12	30	17
From top of Furiki	2 A	3	0	0	1	1
	2 B	5	9	4	2	0
dispersed fishes		32/500	19/500	28/500	37/500	35/500

Towing speed 5 cm/sec.
Experimental fishes 500 (10 times with 50 fishes unit).

Table 5. Dispersed fishes from Furinawa, according to the variation of the illumination and the encirclement area or elapsed time of towing (Experiment 1.)

Elapsed time		start-25sec	25 sec-50 sec	50 sec-75 sec	dispersed fishes
Encirclement area (mean value)		8 m^2 (Ⅰ section)	4.8 m^2 (Ⅱ section)	2 m^2 (Ⅲ section)	
illumination (Lux)	150	1	8	23	32
	75	3	4	12	19
	50	0	10	18	28
	30	0	7	30	37
	10	0	11	34	45

Towing speed 5 cm/sec.
Experimetal fishes 500 (10 times with 50 fishes unit)

実験 2. 曳行速度と駆集率の関係

実験は前述の方法をとり，水中照度を 75 Lux に定め，曳行速度を各々 4〜40 cm/sec の間で実施した。振縄は前実験と同一の物を使用した。実験結果を Table. 6, 7 に示す。

曳行速度 4 cm/sec の時は振木は直立し動揺は殆んど認められない。5〜8 cm/sec では振木は流圧にて若干傾斜し、動揺が時折認められた。16〜40 cm/sec では振木の傾斜甚しく，振木は動揺しその高さを著るしく減少する。然し実験に使用した振木の如く，規格の統一された振木では常に同一運動を行う為に相互に接触しあつて発する音響は余り認められなかつた。Table. 8 は実物の振木の流圧に依る傾斜を観測した結果を示したものである。

曳行速度が緩かな時は，振木の間隙を魚は Fig. 6 の左図に示す如く自由に通過する。曳行速度が速い時は，魚は Fig. 6 の右図如く振縄より置去りにされる様にして脱出する。16〜27 cm/sec に於て振木の上からの脱出が多いのは，振木の高さの減少によるためと考えられる。魚の水槽内での自然の游泳速度は平均5 cm/sec であつた。振縄 4 cm/sec の速度の時，脱出した魚は振縄の外側を追泳して行動する。曳行速度大なる場合は、魚は振縄に沿つて游泳するも追随し得ず脱出の型を取る。魚群も緩速度の場合に比し散乱する

Table 6. The rate of fish-gathering under the influence of towing speed (Experiment 2.)

Towing speed (cm/sec)	Number of gathered fishes	Standerd deviation of gathered fishes	Fish-gathering rate (%)
4	32.6	15.7	65
5	48.1	1.2	96
8	45.3	6.0	91
16	38.1	5.4	77
27	22.9	10.4	46
40	5.3	1.2	11

Experimental illumination 75 lux.
Experimental data was shown the mean value of 10 times with 50 fishes unit.

Table 7. Dispersed location of fishes from Furinawa, changing the towing speed. (Experiment 2.)

Dispersived location		Towing speed (cm/sec) 4	5	8	16	27
From intervals of Furiki	A	0	4	10	0	135
	2 B	0	6	5	0	0
From top of Furiki	A	0	9	1	111	130
	2 B	0	0	0	2	6
From warp		174	0	31	0	0
Total		174	19	47	113	271

Experimental illumination 75 lux.
Experimental fishes 500 (10 times with 50 fishes unit).

Table 8. The inclination of real Furiki, in turn determined by the towing speed

Towing speed	Angle of inclination	Then, the condition of Furiki
6 cm/sec	20°~25°	This speed is suited to 4 cm/sec into the models. It is a slowing for fish-gathering.
9	25°~30°	This speed is suited to 5~8 cm/sec into the model. It is a sufficient speed.
14	45°~50°	This speed is suited to 16~27 cm/sec into the model. It is a fast.
24	75°~80°	This speed is suited to 40 cm/sec into the model. It is a very fast.

Authors took a real furiki in tow into the wooden tank (size. 8 m×0.5 m×0.8 m) and then the towing speed are 6~24 cm sec. Authors observed to the inclination of furiki and the condition of Furiki came under the deta of experiment 2.

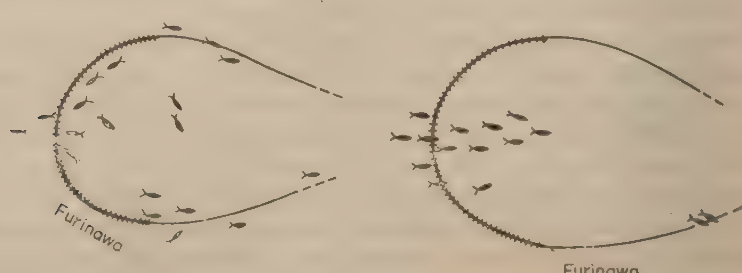


Fig. 6. Style of dispersed fishes from Furinawa at slow (left) and heigh speed (right).

傾向が認められた。

実験 3. 振木数と駆集率の関係

Table 9. The rate of fish-gagthering under the influence of Furiki (Experiment 3.)

Numbers of Furiki	Number of gathered fishes	Fish-gathering rate (%)
167	48.1	96
83	39.6	76
0	0.7	1

Experimental illumination 75 lux.
Towing speed 5 cm/sec. Experimental data was shown the mean value of 10 times with 50 fishes unit.

Table 10. Dispersed location of fishes from Furinawa, changing the numbers of Furiki (Experiment 3.)

dispersed location	Numbers of Furiki		
	167	83	0
From intervals Furiki	10	104	
From top of Furiki	9	0	
dispersed fishes	19	104	420
The rate of fish-gathering	96%	79%	16%

Towing speed 5 cm/sec.
Experimental illumination 75 Lux. Experimental fishes 500. (10 times with 50 fishes unit)

Table 11. Dispersed fishes from Furinawa, according to the variation of encirclement area or elapsed time of Towing (Experiment 3.)

Elapsed time		start-25 sec	25 sec 50 sec	50 sec-75 sec	dispersed fishes
Encirclement area (mean value)		8 m^2 (I section)	4.8 m^2 (II section)	2 m^2 (III section)	
Numbers of Furiki	167	3	4	12	19
	83	1	19	84	104
	0	103	218	99	420

Towing speed 5 cm/sec.
Experimental illumination 75 lux. Exrerimental fishes 500. (10 times with 50 fishes unit)

実験は前述の方法をとり，水中照度 75 Lux，曳行速度 5 cm/sec に定めて実験した。振縄の振木数を 167 枚（これは魚が丁度通過出来得る間隙），83 枚（167 枚より 1 枚間隔で抜き取つたもの），0 枚の三種で実験した。その結果を Table 9, 10, 11 に示す。即ち振木数の変化によつて駆集率が変化する事が分かつた。

結 論 及 び 考 察

1. 照度変化と駆集率の関係について

振縄の駆集条件として 10 Lux 以上が効果的であつた様に，操業に際しては曇天・雨天の日より晴天の日は好漁獲を認めている。これによつても，振縄の効果は照度に左・右されることが分かる。実験照度10 Lux を水深 30 m で測定するには $I=I_0e^{-mx}$ より海面直下に於ては 200 Lux 以上という計算になる。10 Lux を模型振縄の包囲面積 8 m^2 の中心部魚が振縄を発見し得る為の最低照度と推定すれば，実物振縄の包囲面積 70,000 m_2 の中心部の魚が振縄を発見する為の海低照度は，10^3 Lux 前後と計算される。その為には太陽光線の海面照度は 10^5 Lux 以上と云う計算になる。事実 Utterback and Wilson[2] の海中照度測定によれ

ば，10^5 Lux が 30 m の水深について 463～1485 Lux を示し，大約計算照度と合致する。照度と駆集率の相関関係を見るに，10～150 Lux の範囲に於ては相関系数 $r=+0.5$，10～0 Lux に於ては $r=+1$ であつた。前者に於ては照度は必要な条件ではあるが，その高低は余り緊密な関係は認められぬ。然し低照度に於ては駆集率に対して緊密な関係を有し，重要な要素である。照明下，振縄よりの魚の脱出は，曳行の後半に於て多く認められる。換言すれば振縄の包囲面積の圧縮に伴つて増加する。

この事実は振木の威嚇効果には，限界があつて魚に絶対的効果を示すものでない事が分る。振縄の包囲面積と脱出尾数の相関関係を見るに相関係数 $r=-0.94$ であつた。又照明下に脱出した魚の大部分が，振縄を追尾する傾向を示した。以上の事柄よりして，振縄の駆集効果は魚の視覚が非常に大きい要素である事がわかる。

2. 曳行速度と駆集率の関係について

曳行速度によつて駆集率は変化する。これは振木の状態変化に起因すると同時に，魚群の游泳速度との釣合が破れるためである。本実験は平滑な面を曳行した為に，振木相互の接触音は問題にならなかつたが，操業に於ては海底の起伏，障害物による振木の不規則運動が助成され接触音も考慮されねばならぬ。4cm/sec の場合振木は直立して，その間隙を自由に通過した。然し操業に当つては海底の起伏，障害による反転動揺も当然予想される。従つて曳行速度は徒らに速く曳行するより，包囲魚群の游泳速度との釣合に於て定めることが必要である。振木の振動による駆集効果は，即ち広い意味の魚の聴覚によるものと云える。

3. 振木数と駆集率の関係について

振木の数と駆集率の相関系数は $r=+0.94$ で，振木は多い程効果的であるが，実際においては魚の体巾に基いて振木数を決定するのが合理的であろう。

4. そ の 他

各実験を通じて，魚の離脱は振木の間隙より最も多く，振木の上部を越すものは比較的稀れであつた。これは振木の接近を感知した魚は水底に沈降して游泳する為であつた。漁業に於ては，振縄は副漁具として使用され，仮りに振縄より脱出した魚でも，振縄に沿い且つ群を追尾する傾向を示す為に，之等の魚も網の包囲で終局に於ては漁獲の対象になる。本漁業が振縄と網の二段階で漁獲を完了する為，本漁業の漁獲効率はかなり高く評価してよい。

文　　献

1) 檜山義夫：“魚類実験生態論”，厰文書林，東京，(1947)，pp. 41—46, 81—92.

2) 佐々木忠義：“集魚灯” イデア書院，東京，(1953)

Glycylglycine Dipeptidase に對する金属イオンの影響—V. 幽門垂 Glycylglycine Dipeptidase の分離精製に関する研究（其の 1）

斗ケ沢宜久・勝又悌三
（岩手大学農学部）

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—V. Isolation and Purification of the Glycylglycine Dipeptidase (1)

Yoshihisa TOGASAWA and Teizo KATSUMATA

The purification of GG dipeptidase in pyloric caeca of tunny was made according to the adsorption method.

The results were as follows :

1. Poly-aluminium hydroxide A, ortho-aluminium hydroxide γ, ferric hydroxide, kaolin, fuller's earth, active carbon and celite were used as adsorbents.

When 0.06 % ferric hydroxide gel (as Fe_2O_3) was used, GG dipeptidase was adsorbed but not proteinase, while when 2 % suspension of fuller's earth was used, proteinase was adsorbed but not GG dipeptidase. The other adsorbents, they adsorbed peptidase and proteinase together though the adsorbing power differs with each other (Table 2).

2. Under the experimental conditions adopted here, peptidase and proteinase were adsorbed well at pH 4.0–4.5, and scarcely at pH higher than 6.0 (Table 3).

3. Peptidase and proteinase adsorbed were both eluted with 1 % Na_2HPO_4 (pH 7.5–8.5) and 0.05 N NH_4OH (pH 9.0–10.0), and pH was found to exert no effect on elution (Table 4). The elution percentages of the enzymes from ortho-aluminium hydroxide γ was the least showing 23.2 % in GG dipeptidase and 36.7 % in proteinase, and those from the others were 51.2–90.2 % in GG dipeptidase and 49.5–97.3 % in proteinase (Tables 4 and 5).

幽門垂 glycylglycine (GG) dipeptidase が Co^{++}, Mn^{++} 並びに Mg^{++} によつて賦活され，且つ其の反応基の一部として SH 基が関与している事柄に関しては，既に報告した如くである[1)2)3)]。

然し，現在此の GG dipeptidase は未だ純粋な状態では得られず，専らグリセリン抽出液の状態で実験を行つているに過ぎないので，組織から移行する種々不純物の影響をまぬかれ得ないであろう。

従つて，此の度は GG dipeptidase の純粋分離の一手段として，先づ proteinase との分離に関する基礎実験を行つた。

既に peptidase と proteinase の分離に関しては WILLSTATTER[4)], GRASSMANN[5)6)], WALDSCHMIDT-LEITZ[7)8)9)], LINDERSTRÖM-LANG[10)] 等の報告があるが，著者等はマグロ幽門垂の GG dipeptidase（以下単に peptidase と称す）と proteinase の分離を試みたので，其の結果を報告する。

実験方法

1. **酵素液の調製法**： 新鮮なマグロ，*Thunnus orientalis* TEMMINCK et SCHLEGEL 幽門垂を用い，前報[1)2)3)]に従い調製したグリセリン抽出酵素液は不透明の液体で，之を原液（A液）として実験に供した。

1957 年 2 月 18 日受理

2. 酵素力測定法： peptidase の測定法は前報に従つて行い，又 proteinase は WILLSTATTER[11]，GRASSMANN 等[12] の方法に準じ，微量法を考案して測定した。即ち 2 cc のメスフラスコに酵素液 0.2 cc をとり，之に 0.6 % casein (HAMMARSTEN casein 0.6 g に 0.1 N NaOH 7 cc を加え，更に pH 8 の 0.1 N ammonium buffer で溶解 100 cc に稀釈したもの) 1.8 cc を加え，良く混合して後 0.5 cc を取り，pH 7.6 に補正するに要する N/14 KOH の量を求めて残液に加え，蒸溜水を加えて 2 cc としトルオールを加え，37° ± 1°C の恒温水槽中で作用させ，一定時間毎に其の 0.2 cc をとり，0.1 % thymolphthalein を指示薬とし N/100 alcoholic KOH で滴定，更に無水 alcohol 1.8 cc 加えて alcohol 濃度を 90 % とし，standard colour の青色になるまで滴定し，同時に blank test も行い補正した。又 standard colour としては，1/400 M $CuCl_2$ のアンモニア溶液を用いた。

3. 酵素単位表示法

a) **Peptidase 単位：** 前記酵素力測定法に従い，pH 8，37° ± 1°C で 6 時間作用させた時の酵素反応液 0.2 cc に対し N/100 alcoholic KOH 0.05 cc を消費する様な酵素量を 1 peptidase 単位とした。

b) **Proteinase 単位：** 前記酵素力測定法に従い，pH 7.6，37° ± 1°C で 6 時間作用させた時の酵素反応液 0.2 cc に対し N/100 alcoholic KOH 0.05 cc を消費する様な酵素量を 1 proteinase 単位とした。

3. 吸着剤の調製法： 吸着剤として使用した poly-aluminium hydroxide A（礬土A）(suspension 1 cc = 27.3 mg Al_2O_3)，ortho-aluminium hydroxide γ（礬土Cγ）(suspension 1 cc = 15 mg Al_2O_3)，ferric hydroxide (suspension 1 cc = 25.1 mg Fe_2O_3)，kaolin は化学実験学第 2 部第 12 巻（河出書房）に従い調製し，又 fuller's earth は 250°C で 5 時間電気炉中で加熱，植物性活性炭は 100°C で 5 時間加熱したものを使用し，celite は和光純薬株式会社の Johns-Manville 製のものを使用した。

結果並びに考察

1. 硅藻土による粗酵素の濾過

幽門垂グリセリン抽出酵素液（A液）は尚相当の組織を混入する不透明液で，之を硅藻土の薄膜を作つた濾紙で吸引濾過する事により，透明液（B液）を得る事が出来た。此の両液の酵素力を比較した結果，peptidase 並びに proteinase の酵素力には何等影響なく，従つて精製過程の第一段階として此の硅藻土濾過による透明酵素液（B液）を使用した。

2. Proteinase の opt. pH

魚類幽門垂 proteinase の opt. pH を見るに，島田[13] はタラ幽門垂 proteinase の opt. pH を 6.9 (casein 消化 31°C，3 時間)，大谷・島田[14] はカツオの同酵素の opt. pH を 6.5〜7.5 (casein 消化，34°C，24 時間)，又 町田・増永[15] はブリの同酵素の opt. pH を 7.7 (casein 消化，50°C，20 時間) と示している如く，魚類により，又消化条件により，異なつた値が得られている。従つて，先ず予備的にマグロ幽門垂 proteinase の opt. pH を決定した。

結果，Table 1 の如く pH 7.6 に於て最大の分解が見受けられたので，以後同酵素の試験には此の opt. pH 7.6 に於て作用せしめた。

Table 1. Effect of pH on the proteinase activity of glycerine extract of tunny pyloric caeca.

Hrs. of hydrolysis \ pH	6.0	6.7	7.4	7.6	7.8	8.4	9.0
1	0.10	0.11	0.14	0.15	0.14	0.12	0.10
3	0.18	0.23	0.24	0.27	0.25	0.20	0.17
6	0.30	0.32	0.32	0.35	0.33	0.29	0.24
20	0.40	0.43	0.47	0.50	0.49	0.40	0.32

Figures denote cc of N/100 alc. KOH.

3. 各種吸着剤による酵素の吸着

従来 trypsin の吸着剤としては，寒天[16]，アスベスト[16]，綿[16]，濾紙[16]，水酸化アルミニウム[4,5,9,11]，kaolin[4,5,9,11] 等が報告されており，又 peptidase の吸着剤としては水酸化アルミニウム[1,5,7,8,9]，kaolin[5,7]

[17]、ferric hydroxide[8,18]等が用いられている。又，両酵素の分離には水酸化アルミニウム，ferric hydroxide 等が主として用いられているが，著者等は下記方法により peptidase と proteinase の吸着状態を試験し，両酵素の分離に適切な条件を見出さんと次の実験を行つた。

即ち，前記B液 20 cc に N CH_3COOH 0.5 cc を加え，更に $CH_3COONa+CH_3COOH$ buffer (pH 4.0) 1 cc 加え，生ずる沈澱を更に硅藻土の薄膜を作つた濾紙で吸引濾過し，淡黄色 pH 4.5 の透明液を得た。此の酵素液をC液とする。

C液を 5 cc のメスフラスコに 3 cc づつ取り，吸着剤として礬土A，礬土Cγ，ferric hydroxide，kaolin，fuller's earth，active carbon，celite 等の一定量を種々の割合に加え，更に蒸溜水で全液を 5 cc に稀釈後良く振盪し，10 分間室温に放置，次いで遠心分離器を用い，5000 r.p.m. 5分間で吸着剤を分離し，其の上澄液から各 0.2 cc を取り，peptidase 並びに proteinase を前記測定法に従い測定した。尚，control test も同時に同一条件で行つた。

此の際，各吸着剤の吸着割合は peptidase，proteinase 共に吸着前後の酵素液の酵素力を 37° ± 1°C，6 時間に於ける分解力（消費せる N/100 alcoholic KOH の cc 数）で以て表わし，両者の比から吸着剤に吸着された酵素の百分率を算出した。

尚，Table 2 は各種吸着剤の量を異にして吸着せしめた時の peptidase 及び proteinase の吸着%を peptidase の吸着%/proteinase の吸着%…の形式で表わしたものである。

Table 2. Adsorption percentages of peptidase and proteinase in glycerine extract of pyloric caeca of tunny.

Adsorbents \ % of adsorbents	0.06	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	1.0	1.5	2.0
Poly-Al-hydroxide A		16.7/0.0	16.7/10.0	50.0/20.0	58.4/35.0	100/40.0			
Ortho-Al-hydroxide γ		60.0/31.1	80.0/44.9	100/55.2	100/58.7	100/62.1			
Ferric hydroxide	66.7/0.0	73.4/8.4	86.7/33.4	100/45.9	100/45.9	100/58.4			
Fuller's earth			0.0/17.4			0.0/17.4	0.0/39.2	0.0/56.6	0.0/68.5
Kaolin			14.3/0.0		14.3/0.0	14.3/3.4	28.6/3.4	64.3/10.0	85.8/33.4
Active carbon			53.0/7.2			82.4/28.6	88.3/64.3	100/100	100/100
Celite			0.0/7.5			0.0/37.1	0.0/70.4	0.0/77.8	66.7/77.8

Figures in Table show % of GG dipeptidase adsorbed/% of proteinase adsorbed.

礬土A，礬土Cγ の量は何れも Al_2O_3 としての%で表わし，ferric hydroxide の量は Fe_2O_3 としての%で表わしたものである。

結果，礬土Aは 0.6 %添加により peptidase を完全に吸着するが，同時に proteinase 40 %を吸着し，0.3 %添加により peptidase 50 %，proteinase 20 %吸着する。又，0.1 %添加では peptidase 16.7 %を吸着し，proteinase は全く吸着せず，従つて此の量に於て両酵素の分離が可能であるが，吸着せられる peptidase の量が均少に過ぎ，余り効果的とは思われない。

又，礬土Cγ は礬土Aよりも吸着力大で，0.1 %添加で peptidase 60 %，proteinase 31 %を吸着し，0.3 では peptidase 100 %，proteinase 55 %を吸着する。

Waldschmidt-Leitz，Schäffner 等[7] は pH 4.7 で礬土 Cγ 0.13 %を使用し，腸 erepsin を吸着せしめ，trypsin を含まぬ erepsin を調製しており，又 Willstätter，Grassmann[4] は pH 5.0 で 0.05 %を用い，酵母 proteinase を除き，又 Balls，Köhler[19] は腸粘膜から pH 4.0 に於て 0.15 %を使用し，erepsin を吸着せしめ，trypsin を含まぬ酵素液を調製しているが，著者等の実験では礬土Cγ 0.1 %添加で peptase 60 %，proteinase 31 %を吸着し，両酵素を完全に分離する為には，更に吸着剤の量的検討が必要で，proteinase を全く吸着せぬ様なCγ の添加量では peptidase の吸着も均少で，両者の分離は殆んど不可能と

思われる。

ferric hydroxide は 0.06 %の添加で peptidase 66 %吸着するに反し，proteinase は全く吸着せず，0.1 %添加で peptidase 73.4 %，proteinase 8.4 %，又 0.3 %の添加で peptidase 100 %，proteinase 45 %を吸着し，添加量の少ない場合，特異的に peptidase のみを吸着する。従つて，両酵素の分離には ferric hydroxide の 0.06 %添加が最も適切と思われる。

fuller's earth は 0.2~2.0 %添加では peptidase の吸着は全く見られず，之に反し proteinase は 2 %添加で 68.5 %も吸着せられ，両酵素の分離には効果的に思われる。

kaolin の吸着は弱いが，active carbon は両酵素を強く吸着する為，分離には不適当である。

又，celite は pH 6.8 の酵素原液の場合は両酵素を吸着せず，何等の影響も与えないが，pH 4.5 即ちC液に於て 1.5 %添加までは殆んど peptidase を吸着せず，2 %添加で始めて 66 %吸着する。之に反し proteinase は 0.2 %添加で，7.5 %，1.5 %添加で 78 %も吸着する為，proteinase の分離には効果的と思われる。

4. 吸着に及ぼす pH の影響

酵素液の pH を変化させ，吸着条件を検討した。即ち，前記C液を 5 cc のメスフラスコに各々 3 cc づつ取り，0.1 N HCl と 0.1 N NaOH で pH を 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 に調製した後，礬土A，礬土Cγ，ferric hydroxide は夫々 Al_2O_3，Fe_2O_3 として 10 mg，kaolin，fuller's earth，active carbon，celite は各々 100 mg を加え，更に蒸溜水を加えて 5 cc に稀釈，良く混合し，10 分間放置した後，遠心分離 5000 r.p.m.，5 分により上澄液を分離し，其の各々から 0.2 cc を取り，peptidase 及び proteinase を測定した結果が Table 3 の如くである。即ち Table 3 は，酵素液中吸着剤に吸着されずに残存する酵素力を，消費した N/100 alcoholic KOH の cc 数で表わし，之を peptidase の酵素力 proteinase の酵素力 の形式で記入したものである。

Table 3. Adsorption of peptidase and proteinase in glycerine extract of pyloric caeca of tunny at various pH. (GG dipeptidase activity/proteinase activity).

Adsorbents \ pH	4.0	4.5	5.0	6.0	7.0	8.0
Poly-Al-hydroxide A	0.05/0.16	0.03/0.13	0.06/0.17	0.07/0.22	0.08/0.23	0.09/0.23
Ortho-Al-hydroxide γ	0.10/0.17	0.05/0.19	0.10/0.19	0.10/0.19	0.12/0.22	0.12/0.22
Ferric hydroxide	0.03/0.07	0.02/0.08	0.12/0.22	0.20/0.28	0.20/0.30	0.25/0.30
Fuller's earth	0.07/0.03	0.09/0.07	0.09/0.17	0.26/0.28	0.25/0.28	0.25/0.30
Kaolin	0.02/0.15	0.02/0.19	0.14/0.25	0.14/0.29	0.14/0.29	0.14/0.28
Active Carbon	0.04/0.04	0.00/0.00	0.07/0.07	0.10/0.10	0.12/0.09	0.12/0.08
Celite	0.00/0.00	0.02/0.05	0.10/0.20	0.15/0.25	0.15/0.30	0.15/0.30

Figures denote cc of N/100 alc. KOH.

結果，礬土A は pH 4.5 に於ける残存両酵素の滴定値最も少なく，従つて逆に此の条件に於て最も良く両酵素を吸着するが，pH が高くなるにつれて peptidase の吸着は漸次低下し，proteinase は pH 6 以上では殆んど吸着されず，又，礬土Cγ は pH 4.5 で peptidase を最も良く吸着するが，pH 7~8 では殆んど吸着せず，又 proteinase に対しても同様な傾向である。

ferric hydroxide は両酵素に対し pH 4~4.5 に於て最も良く吸着するが，pH 6~8 では殆んど吸着しない。

kaolin も同様で，両酵素に対し pH 4~4.5 で良く吸着するが，pH 5 以上では殆んど吸着せず。以下 fuller's earth，celite は何れも pH 4~4.5 に於て両酵素を良く吸着するが，pH 6~8 では殆んど吸着せず，唯 active carbon のみは pH 7~8 に於て幾分 proteinase を吸着する様である。

先に Waldschmidt-Leitz 等[8,9] は，礬土Cγ による小腸 peptidase 並びに膵臓 peptidase の吸着の最適の pH を夫々 4.0，4.7 とし，又 Linderström Lang 等[17] は kaolin による麦芽 peptidase の最適の吸着条件を pH 8.0，又 Windstätter 等[11] は膵臓 trypsin の礬土Cγ による吸着は pH 7.0 に於て最適であると報告している如く，pH 7~8 位の所で吸着される peptidase や trypsin 等もあるが，マグロ幽門垂の場

合 active carbon がアルカリ側で僅かに proteinase を吸着するのが見受けられるのみで，他の吸着剤によつては，一般に peptidase，proteinase 共に pH 4.0〜4.5 に於て良く吸着せられ，pH が漸次高くなるに従い吸着能が低下し，pH 6 以上では殆んど吸着せられない様に見受けられた。

5. 酵素の溶出

C液を 5 cc のメスフラスコに各々 3 cc づつ取り，礬土Aを Al_2O_3 として 20 mg，礬土Cγ を Al_2O_3 として 10 mg．ferric hydroxide を Fe_2O_3 として 10 mg，又 fuller's earth 100 mg，celite 100 mg を各フラスコに加え，更に蒸溜水を加えて全液を 5 cc とし，之を 10 分間室温に放置して酵素を吸着せしめた後，遠心分離（5000 r. p. m.，5 分間）して上澄液を除いた。次いで adsorbate に 25 %グリセリンを含む N $CH_3COONa + CH_3COOH$ buffer pH 4 を 2.5 cc づつ加えて良く攪拌し，遠心分離して洗液を捨て，此の洗滌操作を 3 回行つて adsorbate に附着する母液を完全に除いた後，この adsorbate に 20 %グリセリンを含む 1 % Na_2HPO_4 並びに同じく 20 %グリセリンを含む 0.05 N NH_4OH を 0.1N HCl 及び 0.1 N NaOH で pH を夫々 7.5，8.0，8.5（以上 1 % Na_2HPO_4 を用う），9.0，9.5，10.0（以上 0.05 N NH_4OH を用う）に調製し，之等を礬土A及び礬土Cγ の時には 2 cc，他の場合は 3 cc づつ加えて充分攪拌後，10 分間放置して酵素を溶出せしめ，後遠心分離して其の上澄液から各々 0.2 cc づつ取り，溶出液中の peptidase 及び proteinase の測定に供した。

尚，酵素溶出の割合は溶出液中の酵素量位を，予め算出した使用 adsorbate 中の酵素単位で除し，溶出した酵素の百分率を求め，之を peptidase の溶出%/proteinase の溶出% の形式で書き表わした。

結果は Table 4 の如くであり，ferric hydroxide のみは更に使用量を変化して溶出試験を行い，結果を Table 5 に示した。

Table 4. Elution percentages of peptidase and proteinase in glycerine extract of pyloric caeca of tunny at various pH. (elution % of GG dipeptidase/elution % of proteinase.)

Adsorbents \ pH	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
Poly-Al-hydroxide A	34.1/97.2	34.1/97.2	34.1/97.2	34.1/85.6	34.1/85.6	51.2/87.2
Oytho-Al-hydroxide γ	19.8/30.6	19.8/36.7	19.8/36.7	19.8/30.6	19.8/30.6	23.2/33.8
Ferric hydroxide	51.5 89.8	64.6 97.3	64.6/89.8	60.0/97.3	60.0/97.3	64.6/97.3
Fuller's earth	0.0/45.7	0.0/49.5	0.0/45.7	0.0/38.0	0.0/41.9	0.0 49.5
Celite	60.1/48.6	75.1/51.4	90.2/48.6	90.2/37.1	90.2/40.0	90.2 45.7

Table 5. Elution percentages of peptidase and proteinase from the ferric hydroxide. (elution % of GG dipeptidase/elution % of proteinase.)

Eluant	1 % Na_2HPO_4 3 cc (pH 8.0)		
Adsorbent \ % of adsorbent	0.06	0.10	0.15
Ferric hydroxide	60.0/0.0	60.0/89.5	55.4/95.8

結果，礬土Aからの溶出は pH が 7.5 以上であれば殆んど変化なく，又溶出剤として 1 % Na_2HPO_4 を使用した場合も，又 0.05 N NH_4OH を使用して pH を変化させた場合も，殆んど差は認められなかつたが，peptidase に比し proteinase が溶出容易な様である。

又，礬土Cγ からの溶出割合は peptidase 20 %前後，proteinase 30 %前後で，他の吸着剤の場合よりも溶出割合が少なく，又 ferric hydroxide からの溶出は比較的容易で，peptidase は 60 %前後，proteinase は 90 %前後溶出される。然し pH 7.5 では peptidase の溶出は幾分低下し，吸着剤として 0.06 %（Fe_2O_3 として）使用した場合は proteinase は全く吸着せず，peptidase のみを吸着する為に，其の溶出割合は peptidase 60 %となるる。

fuller's earth は peptidase を全く吸着せず，従つて其の adsorbate からの溶出は proteinase 40〜50 %前後であり，celite からの peptidase の溶出は pH 8 以上で殆んど 90 %を溶出するが，proteinase の場合は

pH の差による溶出割合には余り変化は認められなかつた。

結局，両酵素の溶出には 1 % Na_2HPO_4 でも，又 0.05 N NH_4OH を用いても殆んど大差なく，一般にアルカリ側に於て両酵素を溶出する事が可能である。

要　　約

マグロ幽門垂の GG dipeptidase の純粋分離の一手段として，吸着法により proteinase との分離を試みた。

1. 礬土A，礬土Cγ，ferric hydroxide，kaolin，fuller's earth，active carbon，celite 等を用い，吸着試験を行つた結果，ferric hydroxide 0.06 % (Fe_2O_3 として) 添加により GG dipeptidase のみが吸着され，又 fuller's earth 2 %添加により proteinase のみが吸着される。然し其の他の吸着剤の場合は，吸着割合に相異はあるが，両酵素を同時に吸着するので，相互の分離には不適当である。

2. 吸着時の pH の影響を試験した結果，何れの場合も pH 4.0〜4.5 に於て両酵素を良く吸着するが，pH 6.0 以上では殆んど吸着は認められなかつた。

3. 礬土A，礬土Cγ，ferric hydroxide，fuller's earth，celite を用い，GG dipeptidase 並びに proteinase を吸着させ，後 pH を変化して溶出試験を行つた結果，pH 7.5〜10.0 間に於て殆んど pH の変化に基づく溶出割合には大差なく，吸着剤の種類別では，礬土Cγ が溶出割合最も少なく，GG dipeptidase 23.2 %，proteinase 36.7 %を溶出するに過ぎず，其の他の場合では大略 GG dipeptidase 51.2〜90.2 %，proteinase 49.5〜97.3 %を溶出する。

文　　献

1) 斗ケ沢宜久・勝又悌三： 岩手大学農学部報告，**2**，66 (1954).
2) 斗ケ沢宜久・勝又悌三： 本誌，**21**，1070 (1956).
3) 斗ケ沢宜久： 本誌，
4) R. Willstätter, W. Grassmann : *Z. physiol. Chem.*, **153**, 250 (1926).
5) W. Grassmann, W. Haag : *Z. physiol. Chem.*, **167**, 188 (1927).
6) W. Grassmann, H. Dyckerhoff : *Z. physiol. Chem.*, **175**, 18 (1928).
7) E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner : *Z. physiol. Chem.*, **151**, 31 (1926).
8) E. Waldschmidt-Leitz, A.K. Balls : *Ber.*, **63**, 1203 (1930).
9) E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck : *Z. physiol. Chem.*, **147**, 286 (1925).
01) K. Linderström-Lang : *Die Fermente u. ihr Wirk.*, **1**, 723 (1936).
11) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Dunaiturria, G. Künstner : *Z. physiol. Chem.*, **161**, 191 (1926).
12) W. Grassmann, W. Heyde : *Z. physiol. Chem.*, **183**, 32 (1928).
13) 島田　清： 本誌，**4**，9 (1935).
14) 大谷武夫・島田　清： 水講，**19**，21 (1923).
15) 町田佐一・増永一雄： 農化，**9**，431 (1933).
16) E. Buchner et al : *Biochem. Z.*, **9**, 436 (1908).
17) K. Linderström-Lang, M. Sato : *Mem. Fac. Sci. Taihoku Imp. Univ.*, **9**, Nr. 2 (1934).
18) E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J.J. Bek, E. Blum : *Z. physiol. Chem.*, **188**, 17 (1930).
19) A.K. Balls, F. Köhler : *Ber.*, **64**, 34, 383 (1931).

Glycylglycine Dipeptidase に対する金属イオンの影響—VI. 幽門垂 Glycylglycine Dipeptidase の分離精製に関する研究（其の 2）

斗ケ沢宣久・勝又悌三
（岩手大学農学部）

Effects of Metal Ions on the Glycylglycine Dipeptidase—VI. Isolation and Purification of the Glycylglycine Dipeptidase (2)

Yoshihisa TOGASAWA and Teizo KATSUMATA

The present investigation was made in order to isolate and purify the GG dipeptidase and proteinase in pyloric caeca of tunny.

The results were as follows :

When the glycerine extract of the pyloric caeca was treated with 0.06 % ferric hydroxide and the enzyme adsorbed was eluted with 1 % Na_2HPO_4, the GG dipeptidase free from proteinase was obtained in the yield of 51.2 % and in the 18.7 times specific activity of the original solution. On the other hand, in the same experiment with 2 % fuller's earth, proteinase free from the dipeptidase was obtained in the yield of 44.6 % and in the 36.5 times specific activity, as shown in Table 2.

前報[1]に於て幽門垂 glycylglycine (GG) dipeptidase の純粋分離の一手段として吸着法により proteinase との分離を試み，其の実験の結果を報告したが，両酵素の分離可能な条件を見出したので，本報に於て前報同様マグロ幽門垂を用いて GG dipeptidase（以下単に peptidase と称す）並びに proteinase を夫々分離し，其の分離過程に於ける両酵素の純度，収量等を明らかにしたので，其の結果を報告する。

実験方法

1. 酵素液調製法

前報[1)2)]通り調製したマグロ（*Thunnus orientalis* TEMMINCK et SCHLEGEL）の幽門垂グリセリン抽出酵素液（A液）を硅藻土の薄膜を作つた濾紙で吸引濾過する事により，酵素力に変化なく透明な酵素液を得る事が出来たので，之をB液として使用した。

2. 酵素力測定法

酵素単位表示法

吸着剤の調製法

等は凡て前報[1)2)]に準じて行つた。

3. 酵素純度表示法[3)4)]

酵素純度は酵素試料中の蛋白態窒素 1 mg. 当りの酵素単位を以て表わした。

此の際蛋白質の定量は，蛋白濃度に応じて酵素液 1〜5 cc をとり，0.21 g/cc trichloroacetic acid (TCA) を酵素液 1 cc に対して 0.5 cc の割合に加え，2〜3 時間室温に放置し，生じた蛋白質の沈澱を吸引濾過した。尚 Balls[5)] はTCAで分離せぬ蛋白質は更に 75°C で 10〜15 分間加熱し，分離しているので，此の方

1957 年2月 18 日受理

法に従つて濾液を更に 75°C で 20 分間加熱し，沈澱の生じた際は（大部分は沈澱を生じない）之を再び濾過し，沈澱は 7％TCA 1cc で洗滌，此の洗滌操作を 3 回繰返して母液を完全に除去した後，其の窒素量を micro KJELDAHL 法によつて測定した。

結果並びに考察

1. Proteinase を含まぬ peptidase の調製法

新鮮なマグロ幽門垂を乳鉢で磨り潰したもの 63.1 g に 315 cc の 50％グリセリンを加え，少量のトルオールを加えて一昼夜室温に放置，之をガーゼと脱脂綿を用いて吸引濾過し，濾液（A液）330 cc を得た。之より 100 cc を取り硅藻土の薄膜を作つた濾紙で吸引濾過し，濾液（B液）100 cc を得た。尚 peptidase は酸に非常に不安定である為，以後の操作は凡て氷で冷却しながら行つた。即ち，此のB液 40 cc をとり，冷却しつつ，N CH_3COOH 1 cc と N $CH_3COONa+CH_3COOH$ 緩衝液（pH 4.0）2 cc を加え，生じた沈澱を再び硅藻土の薄膜を作つた濾紙で濾別し，透明濾液（C液）41 cc を得た。此の濾液は pH 4.5 である。之より 15 cc を取り，蒸溜水を加えて 25 cc としたものを吸着原液とし，別に 15 cc を取り，ferric hydroxide gel 0.58 cc（Fe_2O_3 として 15 mg に相当し，peptidase のみを吸着する量）を加え，蒸溜水を加えて 25 cc に稀釈，良く混合して 10 分間氷冷しながら放置後，遠心分離（5000 r.p.m.，5分間）し，上澄液即ち吸着残液 24 cc を得た。更に adsorbate に氷冷した pH 4.0 のグリセリン 25％を含む N $CH_3COONa+CH_3COOH$ 緩衝液 12.5 cc を加えて良く攪拌洗滌し，遠心分離により洗液を分かち，此の洗滌操作を 3 回繰返して完全に母液を除いた。次いで adsorbate に 20％グリセリンを含む 1％ Na_2HPO_4 15 cc 加えて良く攪拌後 30 分室温に放置して酵素を溶出せしめた後遠心分離し，溶出液 15 cc を得た。

2. Peptidase を含まぬ proteinase の調製法

実験 1 の場合と同様，C液（pH 4.5）15 cc を取り，蒸溜水を加えて 25 cc としたものを吸着原液とし，別にC液 15 cc に加熱処理した fuller's earth 500 mg（peptidase を吸着せず proteinase のみを吸着する量）を加え，蒸溜水で 25 cc に稀釈する。良く混合して室温で 10 分間放置吸着させ，遠心分離（5000 r.p.m，5分）して上澄液 23 cc を得た。更に adsorbate に pH 4.0 の 25％グリセリンを含む N $CH_3COONa+CH_3COOH$ 緩衝液 12.5 cc を加えて良く攪拌洗滌し，遠心分離（5000 r.p.m.，5 分）して洗液を捨て，此の操作を 3 回行つて母液を完全に除去した。次いで adsorbate に 20％グリセリンを含む 1％ Na_2HPO_4 15 cc を加えて良く攪拌し，30 分室温に放置して酵素を溶出させ，遠心分離して溶出液 15 cc を得た。

3. 精製過程に於ける両酵素の収量並びに純度

Tables 1，2 は上の精製過程に於ける両酵素の収量並びに純度等を示したものであり，表中の収量は酵素原液（A液）中の酵素単位で各精製過程に於ける酵素液の酵素単位を除して求め，百分率で表わしたもので

Table 1. Preliminary purification of the enzyme solution.

		A*	B*	C*
	Volume (cc)	40	40	41
	Total Protein N (mg)	24.7960	9.272	4.0426
Peptidase	Total peptidase unit	21328	21328	16398
	Yield (%)	100	100	76.8
	Specific activity**	860	2300	4056
	Ratio of specific activity to A	1	2.67	4.7
Proteinase	Total proteinase unit	20794	20794	17491
	Yield (%)	100	100	84 1
	Specific activity**	838	2242	4326
	Ratio of specific activity to A	1	2.6	5.16

* A…Original glycerine extracts of tunny pyloric caeca.
B…Celite filtrate of A.
C…Filtrate of B adjusted to pH 4.5 with the addition of acetic acid and acetate buffer.

** Peptidase unit/Protein-N (mg), Proteinase unit/Protein-N (mg).

Table 2. Purification of the enzymes by an adsorption method.

	Peptidase			Proteinase		
	Adsorbent (0.06 % Ferric hydroxide)			Adsorbent (2 % Fuller's earth)		
	Enzyme soln.*	Unadsorbed	Adsorbed** and eluted	Enzyme soln.*	Unadsorbed	Adsorbed*** and eluted
Volume (cc)	68.3	65.6	41	68.3	62.8	41
Total protein N (mg)	4.0426	2.4928	0.6765	4.0426	2.3236	0.3034
Total unit	16390	5247	10932	17301	5028	9292
Yield (%)	76.8		51.2	83.2		44.6
Specific activity	4054		16159	4279		30626
Ratio of specific activity to A	4.7		18.7	5.1		36.5

* C in Table 1 was diluted to 3/5.

** Eluted with 1 % Na_2HPO_4 and free from proteinase.

*** Eluted with 1 % Na_2HPO_4 and free from peptidase.

ある。

この結果 peptidase に就いては，酵素液中の窒素量は精製過程の進むにつれ漸次減少し，原液に於て 24.8 mgN/40 cc のものが硅藻土濾過により約 9 mg に減少，又 peptidase の収量はB液までは酵素原液と同様であるが，酷酸処理した C 液で既に其の 76.8 %に低下する。之は peptidase が酸に不安定である事が原因の一つと考えられる。

然し一方 pH 4.5 で沈澱する蛋白質の除去により酵素液中の窒素量が約 1/6 まで減少したものが得られた。又収量も精製と共に減少し，最終溶出液中の peptidase は原液に対し 51.2 %の収量を示したが，specific activity はB液で 2.6 倍に、又C液で 4.7 倍に高まり，最終溶出液で 18.7 倍に高まつた酵素液が得られた。

又 proteinase に就いても，酵素液中の蛋白態窒素量は精製と共に減少し，収量も C液で 84.14 %に低下，最終溶出液で 44.6 %であつたが，一方 specific activity はB液で 2.6 倍に，又C液で 5.1 倍に高まり，最終溶出液では 36.5 倍に高まつたものが得られた。

要　　約

マグロ幽門垂から GG dipeptidase と proteinase を分離し，各々其の分離過程に於ける収量並びに純度等を算出した。結果は次の如くである。

1. 硅藻土の薄膜を作つた濾紙を使用し，グリセリン抽出酵素液を吸引濾過する事により GG dipeptidase 並びに proteinase の酵素力を変化する事なく透明な酵素液を得．之に ferric hydroxide 0.06 % (Fe_2O_3 として) 添加し，pH 4.5 で GG dipeptidase のみを吸着させ，之を 1 % Na_2HPO_4 で溶出する事により，収量が原液に対し 51.2 %，specific activity が 18.7 倍の GG dipeptidase を得た。

2. 又，前記硅藻土で処理した透明酵素液に fuller's earth 2 %添加し，pH 4.5 で proteinase のみを吸着させ、之を 1 % Na_2HPO_4 で溶出する事により，収量が原液に対し 44.6 %，specific activity が 36.5 倍に高まつた proteinase を得た。

文　　献

1) 斗ケ沢宣久・勝又悌三：

2) 斗ケ沢宣久・勝又悌三： 本誌，**21**，1070 (1956).

3) S. Schwiner, B. Pardee : *Adv. in Enzymol.*, **14**, 375 (1953).

4) 江上不二夫等編： 標準生化学実験，216 (1953).

5) A.K. Balls, H. Lineweaver : *J. Biol. Chem.*, **130**, 669 (1939).

Removal of the Membrane of the Dog Salmon Egg by Means of Proteolytic Enzymes*

Yasuhiko KANOH and Tadashi S. YAMAMOTO
(*Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo, Japan*)

Introduction

In connection with the problems of the hatching enzyme, properties of membrane of fish egg have become a subject of discussion not only in chemical aspect but likewise in biological point of view. Surveying the hatching enzyme of teleostean fishes, BOURDINE ('26) has suggested that the egg membrane of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, is attacked to some extent by pancreatin ; on the same material YOUNG and IMMAN ('38) have reported that it is not attacked by trypsin (pH 8.4) but is slightly by pepsin (pH 2.6). From the examination of effects of various enzymes on the membrane of *Oryzias*-egg, ISHIDA ('44) has also stated that pancreatin and trypsin digest the egg membrane completely. More recently, the junior author has shown that the envelopes of lamprey egg are composed predominantly of protein and also that with use of pepsin dissolved in M/200 RINGER's solution (pH 1.8) the naked fertilizable egg is obtained (YAMAMOTO '56).

The present investigation makes a part of a series of studies in the activation or fertilization of fish eggs, and some different kinds of proteolytic enzymes were employed in order to find a procedure for removing the membrane of the egg of dog salmon, *Oncorhynchus keta***.

It is a pleasure to acknowledge our gratitude to Prof. A. ICHIKAWA for his encouragement. We are also indebted to the members of the staff of the Hokkaido Fish Hatchery for their allowing the collection of the material used in the present study.

Material and Method

The materials used here were all taken from matured individuals of dog salmon, *Oncorhynchus keta*. As already reported by the senior author (KANOH '50), the matured *Oncorhynchus*-egg can be kept in isotonic RINGER's solution without suffering any changes. Accordingly, enzymes and the other agents were all used after having been dissolved in the RINGER's solution***. As the proteolytic enzymes, pepsin, trypsin, pancreatin, and papain (activated with cysteine·HCl or KCN) were employed. The technical details will be described in each section. All the experiments were performed at room temperature

Received may 8, 1957.

* Contribution No. 375 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

** The main component of egg membrane of the present material, *Oncorhynchus keta*, has been ascertained by HAMANO ('49) to be protein.

*** Composition of the present isotonic RINGER's solution : M 6.5 NaCl 100 parts + M 6.5 KCl 2.8 parts + M/10 $CaCl_2$ 3.4 parts.

(12°—18°C.).

Results

Experiment 1. In view of the fact that the egg membrane of fish egg is composed predominantly of protein, effect of the treatment with a single proteolytic enzyme was first examined :

The eggs were immersed in one of the RINGER's solutions previously added respectively with pepsin (pH 1.8), papain (pH 6.5, activated with cysteine-HCl), trypsin (pH 9.0), or pancreatin (pH 9.0). Concentrations of pepsin, trypsin, and pancreatin in these RINGER's solutions were all 0.2 %, while that of papain was 2 %. PH was adjusted with HCl or NaOH in every case.

The results obtained were negative : at least in 24 hours, no changes were observed except in the case of pepsin where the eggs became more translucent. This increase in translucency in pepsin solution, however, might be due not to the enzyme action, but to the acidity of the medium (pH 1.8), because the eggs became markedly translucent in the same manner when immersed in RINGER's solution merely acidulated to pH 1.8 by the addition of HCl.

It is said that some proteins possessing S-S bridges can hardly be dissolved by a single treatment with enzymes, but there sometimes happens that even such proteins are dissolved by an enzymatic treatment if treated beforehand with cysteine or thioglycolate presumably owing to the reduction of S–S to SH. An example of such a case may be given by the fact that the fertilization membrane of the sea urchin egg which is not attacked by trypsin alone, can be dissolved by a double treatment of thioglycolic acid and trypsin (MONROY and RUNNSTROM '48). Furthermore, envelopes of developing frog egg are completely removed by treatment with papain (activated with cysteine-HCl) and sodium thioglycolate (SPIEGEL '51).

As to S–S bridges in egg membrane, their existence has been proved by BROWN ('55) histochemically in trout egg. To the present material, on that account, was applied the double treatment with 2.5 % sodium thioglycolate-RINGER's solution (pH 9.0 –11.0) followed by papain or pancreatin solution. But the results were negative for all lengths of treatment which varied from 30 minutes to 3 hours.

Experiment 2. As enzymes behave generally in a high specific manner (BERGMANN and FRUTON '41), it is not unlikely that two successive treatments with different kinds of enzyme might be necessary for the present purpose. Then, in the next experiment, a double treatment with pepsin and pancreatin was put into practice.

The eggs were kept immersed in 0.2 % RINGER's solution of pepsin (pH 1.8) for 3 hours and then transferred into 0.2 % RINGER's solution of pancreatin (pH 9.0). As control experiments another batch of eggs was treated as follows : (A) RINGER's solution merely acidulated with HCl (pH 1.8) → pancreatin-RINGER's solution (pH 9.0) ; (B) RINGER's solution merely acidulated with HCl (pH 1.8) → RINGER's solution merely alkalized with NaOH (pH 9.0) ; (C) pepsin-RINGER's solution (pH 1.8)→RINGER's solution merely alkalized with NaOH (pH 9.0).

Fortunately, positive results were obtained in the case of the double treatment with pepsin and pancreatin. But, the double treatment with RINGER's solution merely acidulated with HCl and pancreatin (A) yielded a positive result as well. It becomes apparent, conditions for obtaining a positive therefore, that preparatory result seems to be established by virtue of mere acidity but not of enzyme in the RINGER's solution applied. Thus, using such double treatment of acidulated solution and pancreatin, attempts were made in order to determine a suitable procedure for removing the egg membrane.

First, the optimum time of immersion in the acidulated RINGER's solution (pH 1.8) was determined in the following manner : The eggs, after being kept immersed in a RINGER's solution acidulated with HCl (pH 1.8) for an appropriate length of time, were washed with normal RINGER's solution and transferred into 0.2% pancreatin-RINGER's solution (pH 9.0). The results obtained are shown in Table 1. It will be seen that 10 to 30 minutes immersion is necessary for removing the egg membrane but more prolonged treatment with the acidulated solution leads to cytolysis of the egg.

Table 1. Effects of duration of the pretreatment with acidulated RINGER's solution on removing the egg membrane by pancreatin-RINGER's solution.

Duration of pretreatment with acid.-R. (min.)	0	1	1.5	5	10	15	30	45	60
Time required for removal of the egg membrane in pancreatin-R. (hrs.)	—	—	—	25	20	20	20	20	20
Egg cytolysed (%)	0	0	0	0	0	0	0	15	50

Secondly, pH of RINGER's solution was varied from 1.8 to 4.0. It was found that pH value of the acidulated RINGER's solution should be 1.8 for the present purpose, that is, for removing the egg membrane ; also solutions acidulated with HCl, HNO_3 or H_2SO_4 gave the same results.

As to the pancreatin-RINGER's solution, its optimum pH was determined in the following way : The eggs were treated with acidulated RINGER's solution (pH 1.8) for 15 minutes, washed with normal RINGER's solution, and then transferred into 0.2% pancreatin-RINGER's solutions of varying pH values. Figure 1 shows a typical result. From this figure, it is apparent that optimum pH value is about 11.0. To test the possibility of more rapid digestion of the membrane, the concentration of pancreatin solution was increased, leading to the finding that the concent-

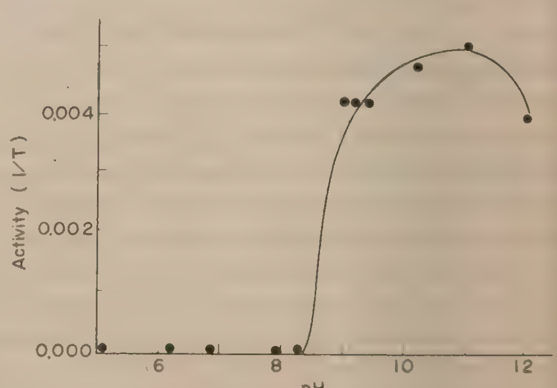


Fig. 1. Activity of pancreatin in the double treatment at various pH values. Eggs were pretreated with acidulated RINGER's solution (pH 1.8) for 15 minutes. *T*, time required for removal of membrane in pancreatin solution.

ration–from 0.2 to 0.5 % is the most suitable and that in more concentrated solutions thee ggs undergo cytolysis.

From the results mentioned above it may well be concluded that the most suitable procedure for removal of the membrane of dog salmon egg is as follows : Immersion in acidulated RINGER's solution (pH 1.8) for 15 minutes → washing with normal RINGER's solution→immersion in 0.2 % pancreatin–RINGER's solution (pH 11.0).

Experiment 3. Regarding the state of the egg deprived of its membrane by the procedure described above, it must be remembered that it differs slightly but distinctly from the intact egg. To describe in detail, in the intact egg the blastodisc was not distinct, nucleus being in metaphase stage, and the so-called cortical alveoli were found in cortex (cortical cytoplasm) ; on the other hand, in the denuded egg, the blastodisc was already rather distinct and the nucleus in it had proceeded to the stage of pronucleus, though the cortical alveoli remained unbroken (Fig. 2). It is of interest to note, however, that such denuded egg was still fertilizable. That is, when the denuded egg was washed with normal RINGER's solution, inseminated with sperm suspension, and transferred into tap water, it began polyspermic cleavage without breakdown of the cortical alveoli, as shown in Figure 3. On the other hand, when the eggs previously inseminated in normal RINGER's solution

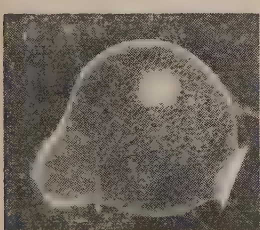


Fig. 2. Photomicrograph of an egg denuded by double treatment with acidulated RINGER's solution and pancreatin–RINGER's solution. *ca.* ×3.



Fig. 3. Section of a denuded egg removed of its membrane, inseminated in RINGER's solution, and immersed in tap water for 10 hours, showing cortical alveoli unbroken. *ca.* ×50.

were treated with acidulated RINGER's solution and further with pancreatin solution, dissolution of egg membrane was observed also in this case. When such inseminated and denuded eggs were put into tap water, they revealed monospermic cleavage to occur, while were kept unbroken their cortical alveoli. In this case monospermic cleavage undoubtedly took place, though blastomeres became more and more irregular in arrangement with time. To make clear these states of matters, an experiment was made in which pancreatin dissolved in a RINGER's solution, whose concentration nad been adjusted intentionally to M/8, was used in the treatment of the second stage. Cleaving of the denuded egg in its development proceeded quit regularly in normal fashion to attain to blastula stage, while the cortical alveoli remained unbroken.

Experiment 4. Now, a question arises as to what enzyme contained in pancreatin is effective at all for egg membrane of dog salmon to be dissolved through the double treatment stated above. It may probably not be trypsin, since trypsin is said to be disinte-

grated in the range of high pH. In fact, the egg membrane was not removed by means of double treatment of acidulated RINGER's solution and 0.2 % trypsin-RINGER's solution (pH 9.0—11.0).

In the next, water extract of 5 % pancreatin (prepared in 40 hours in a refrigerator) was used ; this was first filtered and then added with methanol till final concentration of methanol attained to 75 %. Subsequently, the precipitation there formed was dried and dissolved in 100 m*l*. of RINGER's solution (pH 11.0). When the egg treated previously with acidulated RINGER's solution was immersed in this solution, its membrane was removed within19 hours. Accordingly, it may be supposed that some tryptic enzyme other than true trypsin in pancreatin is effective in removing the egg membrane because cathepsin contained in pancreatin is thought to be inactivated by alcohol-treatment. However, there arises a further doubt as to whether the cathepsin contained in pancreatin actually has no effect. To clarify this point, the eggs previously treated for 15 minutes with acidulated RINGER's solution were transferred into RINGER's solution containing 0.5 % papain (activated with KCN, pH 7.0) which was known as a typical cathepsin. Table 2 shows the results making clear that the egg membrane is attacked also with such cathepsin.

These experimental results suggest that in pancreatin there are at least two different kinds of enzymes effective indeed for dissolving the egg membrane : tryptic enzyme and cathepsin !

Table 2. Efficiency of papain-RINGER's solutions of various KCN concentrations (pH 7.0) in removing the membrane from eggs pretreated with acidulated RINGER's solution for 15 minutes.

Concentration of KCN (%)	Time required for removal of the egg membrane in papain-RINGER's solution
0	Immeasurably long
0.0001	〃
0.001	〃
0.01	〃
0.1	26 hrs.
0.1*	Immeasurably long

* Without papain (control).

Discussion

It has been shown that the egg membrane of *Oncorhynchus*-egg is composed of three layers ; the outermost layer is hyaline and the other two layers makes real chorion and have numerous fine radial canals. According to AOKI ('41) on the isolated membrane of *Oncorhynchus*-egg, the innermost layer swells easily, then dissolves away in acid solution. Now, in the case of the present study, it has been observed that, when the egg is treated with acidulated RINGER's solution (pH 1.8), the translucency of the membrane increases rapidly under marked wrinkling. Observations on paraffin-sections of the egg thus treated and fixed *in toto* with basic lead acetate-formalin mixture revealed that, while the fine radial canals of the real chorion had gone out of sight, any visible changes had occurred

neither in the outermost layer of the membrane nor in the egg proper. Thus, the changes of the egg observed externally when kept immersed in acidulated RINGER's solution may well be regarded to be dependent mainly on the changes given rise to in the real chorion of the egg.

As stated already, in order to dissolve the membrane with pancreatin it is necessary to treat the egg previously with acid solution. This fact may lead to the consideration that the acid treatment brings about some molecular changes in the membrane that facilitate the attack by the enzyme. Such molecular changes are, however, still a matter of speculation, the resolution of which are to be given by further investigations.

The egg membrane of *Oryzias*-egg is completely digested by a single treatment with pancreatin or trypsin (ISHIDA '44), and also in the lamprey the naked fertilizable egg is easily obtained by a single treatment with pepsin solution (YAMAMOTO '56). In the present material the egg membrane is finally attacked by proteolytic enzyme, *i.e.*, by tryptic enzyme and cathepsin as it happens in *Oryzias* and lamprey egg. It is to be noted, however, that, differing from the egg membrane of *Oryzias* and lamprey, the membrane of the present material, *Oncorhynchus*-egg, makes no response to a single treatment with pancreatin. In order to attack egg membrane with success, therefore, pretreatment with acid seems to be a *sine qua non* so far as the present study is concerned.

The egg of *Oncorhynchus* is not activated in RINGER's solution, that is, in this solution the egg does not show for a long time any signs of activation such as breakdown of cortical alveoli and formation of a distinct blastodisc containing a nucleus in an advanced stage beyond metaphase (KANOH '50).

In denuded eggs obtained after double treatment with acidulated RINGER's and pancreatin-RINGER's solution, the cortical alveoli remain unchanged like those in intact unfertilized eggs, whereas distinct blastodisc with pronucleus has already been formed as in the case of activated eggs. It may be said, therefore, that such double treatment induces egg activation without breakdown of cortical alveoli. It is, however, noticeable that the denuded egg obtained by such treatment retains the capacity for fertilization and yet begins remaining cortical alveoli polyspermic cleavage when inseminated and immersed in tap water. Almost similar phenomena are shown in the case of the egg previously inseminated and denuded by the same double treatment. That is, in the denuded inseminated egg thus obtained, breakdown of the cortical alveoli does not occur, though monospermic cleavage does proceed.

From these results it is likely that, although the double treatment induces egg activation, the mechanism of the breakdown of the cortical alveoli is irreversibly damaged by this treatment. Furthermore, in the case of such activation, the protective change against supernumerary spermatozoa, namely the block to polyspermy, which is established in normal fertilization is supposed to remain unaccomplished, since the denuded egg shows polyspermic cleavage when inseminated. The same seems to be applicable also to the eggs previously inseminated, then denuded, for such eggs began cleavage in a polyspermic fashion when they were again inseminated after treatment with pancreatin solution.

The activation not accompanied by breakdown of cortical alveoli and polysperm-entry

induced by the described double treatment will be further discussed elsewhere.

Summary

For removing the membrane of dog salmon egg a single treatment of it with proteolytic enzymes is not sufficient. Enzymatic dissolution of the egg membrane is attained only for the eggs that have previously been treated with acid solution. The most suitable procedure for removing the egg membrane is composed of a series of treatments as follows : 15 minutes immersion in acidulated RINGER's solution (pH 1.8) → washing with normal RINGER's solution → immersion in 0.2% pancreatin-RINGER's solution (pH 11.0). The egg thus denuded is still fertilizable.

Pancreatin enzymes effective for dissolving the egg membrane are likely to be tryptic enzyme and cathepsin.

The double treatment with acid and pancreatin solution induces egg activation without breakdown of cortical alveoli. About this phenomena some discussion is presented.

References

AOKI, K. : 1941, On the swelling of the envelope of salmon egg. *Kagaku*, **11**, 517 (in Japanese).

BERGMANN, M. and J.S. FRUTON : 1941, The specificity of proteinases. *Adv. Enzymol.*, **1**, 63-98.

BOURDINE, J. : 1926, Le mécanisme de l'éclosion chez téléosteéns. IV. Physiologie du liquide périvitellin des oeufs de téléosteéns a l'éclosion. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **95**, 1242—1243.

BROWN, C.H. : 1955, Egg-capsule proteins of selachians and trout. *Quart. J. Micr. Sci.*, **96**, 483—488.

HAMANO, S. : 1949, On the swelling layer of egg membrane of salmon, *Oncorhynchus keta*. *Physiol. and Ecol.*, **3**, 43—46 (in Japanese with English Résumé).

ISHIDA, J. : 1944, Further studies on the hatching enzyme of the fresh-water fish, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Jap.*, **22**, 155—164.

KANOH, Y. : 1950, Über Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. I. *Annot. Zool. Jap.*, **24**, 13—21.

MONROY, A. and J. RUNNSTRÖM : 1948, Some experiments pertaining the chemical changes occurring at the formation of the fertilization membrane of sea-urchin egg. *Ark. Zool.*, **40** A, nr. 18, 1—6.

SPIEGEL, M. : 1951, A method for the removal of the jelly and vitelline membrane of the egg of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, **111**, 544.

YAMAMOTO, T.S. : 1956, Digestion of egg envelopes and their chemical properties of the lamprey's egg, *Lampetra japonica*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* (*Zool.*), **12**, 273—281.

YOUNG, E.G. and W.R. IMMAN : 1938, The protein of the casing of salmon eggs. *J. Biol. Chem.*, **124**, 189—193.

するめのひれから Putrescine の単離

麓 禎 康
（神戸大学教育学部）

Isolation of Putrescine from Fin of Dried Squid

Yoshiyasu Humoto

A base was isolated from fin of dried squid (*Ommastrephes sloani pacificus*) as a picrate, which was found to be putrescine dipicrate on analysis (Table 1). The yield of picrate was 0.4 g from 100 g of the starting material.

筆者はさきに[1] 富田雅次博士の示唆によつて Octopine を単離したときに使用したするめ（原料：スルメイカ *Ommastrephes sloani pacificus*）の二次加工廃棄物の皮に混っていたひれから，putrescine を picrate として単離した。この putrescine がイカの正常成分であるか，するめ製造の過程において，イカ自体の酵素により，又は付着した細菌の作用によつて生じたかは検討を要する問題である。しかし筆者の研究室では人員及び経費の現況から，この研究を発展させることは困難であり，かつ昭和 30 年夏季に北陸・東北地方でイカによる中毒が発生し，その原因が判明しなかつたので，現在までの実験結果を報告し，中毒問題に関する一つの資料としたいと考える。

Putrescine は単独では無害であり，histamine との共同作用もないが，その前駆物質の一つとされている agmatine は histamine と共存するときは，著しくその毒作用を増強することが林[2] によつて報告されている。putrescine がイカ又はするめの中に存在したという例の報告はないようであるが，この種プトマインが動物から検出された少数の例が報告[3] されている。

実験――するめの二次加工廃棄物中からひれを選び，その 100 g. を 2 回温浸し，浸出液を併合してタンニン酸及び塩基性酢酸鉛で順次除蛋白し，過剰の鉛を硫酸で除く。濾液を強く濃縮して析出物を除き，燐タングステン酸で塩基を沈澱せしめる。沈澱を常法で分解して得た遊離塩基溶液を硝酸酸性とし，硝酸銀溶液を加えて生ずるプリン塩基の沈澱を濾別し，滤液は銀バリタ法で histidine-arginine-fraction を沈澱せしめる。この沈澱を硫化水素で分解して得た遊離塩基溶液を濃縮し，熱飽和ピクリン酸溶液を加えると，褐色針状の結晶を生ずる。収量 0.4 g.，熱水から 2 回再結晶したものは黄褐色針状，収量 0.1 g. である。232°C から変色し，254°C で分解発泡する。バリタでアルカリ性とし，加熱しても臭気はない。元素分析の結果は，Table 1 の如く putrescine dipicrate によく一致した。

Table 1. Analysis of Picrate

	C (%)	H (%)	N (%)
Found	35.04	3.30	20.09
Calcd. for $C_4H_{12}N_2 \cdot 2\,C_6H_3N_3O_7$	35.11	3.31	20.49

一部を以て flavianate を作つた。黄色微細針状結晶，分解点 261°～270°C プレパレーション不足のため，これ以上のデーターを欠くが分離した塩基は putrescine と同定してよいであろう。

元素分析は丸山信吉博士の御好意により，武田製薬研究所でしていただいた。こゝに関係各位に感謝の意を表する。

文 献

1) Y. Humoto : Ztschr. f. physiol. Chem. **297**, 47 (1954).
2) 林 誠・他 : 薬誌 **74**, 1145, 1148 (1954) ; **75**, 1, 663 (1955).
3) D. Ackermann : Ztschr. f. physiol. Chem. **71**, 193 (1920).

1957 年 5 月 20 日受理

サバ肝臓リポキシダーゼ様酵素の特性

清 水 千 秋・福 原 忠 信
(長 崎 大 学 水 産 学 部)

The Specificity of Lipoxidase-like Enzyme in Mackerel Liver

Chiaki SHIMIZU and Tadanobu FUKUHARA

Succeeding to the previous paper, the present paper deals with the specificity of mackerel liver enzyme on the oxidation of fatty acid and Vitamin A.

This enzyme exhibits optimal activity at pH 6.8—7.0 (Fig. 1) and at 17°C. (Fig. 2). Though the optimum pH resembles to the other results, but the optimum temperature do not coincides with the other results on lipoxidase. From this study we can not certify the mackerel liver enzyme is the same with the soy-bean lipoxidase or not.

I 緒 言

前報[1]において私達はサバ肝臓貯蔵中におけるビタミンAの減少は，主として肝臓中のヘミン並びにリポキシダーゼ様酵素の作用により，高度不飽和脂肪酸が酸化されて生ずる酸化生成物のため，二次的にビタミンAが酸化されるためであることを報告した。今回はサバ肝臓中のリポキシダーゼ様酵素を従来報告されているものと比較するために、その特性をしらべたところ，最適 pH は 6.8〜7.0 で，G. N. SMITH[2]，M. M. R. KHAN[3]，福場[4] 等の報告と大体似た結果が得られた。しかし最適温度は 17°C で，J. B. SUMNER[5]，G. N. SMITH[6]，R. T. HOLMAN[7] 等が大豆リポキシダーゼから得た価より低く，M. M. R. KHAN[5] がニシン (British Columbia Herring) 血合肉で測定したものよりやや高く，従来の文献値のほぼ中間値を得たので，これらの結果について報告する。

II 実 験 方 法

1. サバ (*Scomber tapeinocephalus* BLEEKER) 肝臓リポキシダーゼ様酵素の最適 pH

従来リポキシダーゼの測定にあたつては，基質に脂肪酸のメチルエステル或は金属塩が多く使用されている。しかし，福場[4]はリノール酸メチルエステルは緩衝液に溶解しないために，乳化条件の相違，乳化後の経過時間等により，その反応に著しい差異を生ずるので，これを基質に使用した実験は再現性に乏しいとのべているが，私達は前報[1]において基質に亜麻仁油脂肪酸メチルエステルを使用し，pH 7.0 で反応させたところ，反応開始後4時間迄は反応が時間に比例し，かつ数回の実験でも同じ結果が得られたので，本報告においても亜麻仁油脂肪酸メチルエステルを基質に使用し，次のようにして試験

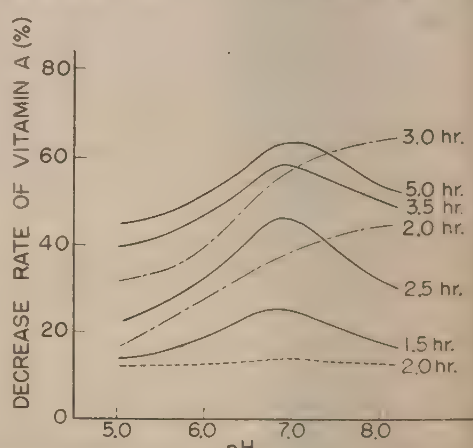


Fig. 1. Effect of pH on the activity of crude mackerel liver enzyme.
reaction temperature : 25°C.

vitamin A : ca. 6 mg. acetone solution.
methylester of fatty acid of linseed oil : 60 mg acetone solution.
solid lines : crude liver enzyme.
dotted line : boiled enzyme solution (100°C. 5 min.).
chain lines : 0.5 mg. hemin.

1957 年 2 月 9 日受理

した。

a. 試験にはすべて前報[1]と同じものを使用した。即ち 50 cc 三角フラスコにビタミンAのアセトン溶液 1 cc（ビタミンA ca. 6 mg），亜麻仁油脂肪酸メチルエステルのアセトン溶液 1 cc（脂肪酸メチル 60 mg），アセトン 1 cc，粗酵素液 10 cc および M/20 燐酸緩衝液（pH 5.0〜8.2）2 cc，3 %卵アルブミン溶液 1 cc を加え，良く混じた後 25°C 定温器に入れ，一定時間毎に残存ビタミンAを測定した。なお，対照試験として酵素液を 5 分間煮沸後乳化して使用した。

b. 50 cc 三角フラスコに亜麻仁油脂肪酸メチルエステルのアセトン溶液 1 cc（脂肪酸メチル 60 mg），ビタミンAのアセトン溶液 1 cc（ビタミンA ca. 6 mg），ヘミンを添加した 3 %卵アルブミン溶液 1 cc（ヘミン 500 γ），M/20 燐酸緩衝液（pH 5.0〜8.3）2 cc，0.35 % 卵アルブミン溶液 10 cc，アセトン 1 cc を加えて良く混じた後，25°C 定温器に入れて反応させた。

各反応液に一定時間後エタノール 5 cc を加え，一定量のエーテルで脂肪酸メチルおよびビタミンAを抽出し，抽出液を水洗，脱水後エーテルを除き，ビタミンAを測定した。実験結果は Fig. 1 に示す通りである。

2. サバ肝臓リポキシダーゼ様酵素の最適温度

福場[8]はリポキシダーゼの活性度測定にビキシンの代りにクロチン（crocin）を使用しているが，私達も前報[1]と同様にこの方法にしたがつて各温度における酵素液の活性を測定した。即ち 50 cc 三角フラスコに適当濃度のクロチン液 1 cc，粗酵素液 4 cc，M/20 燐酸緩衝液（pH 7.0）1 cc を加え，各温度に保つた後，亜麻仁油脂肪酸メチルエステルのアセトン溶液 0.2 cc（脂肪酸メチル 20 mg）を加えて反応させ，一定時間後エタノール 10 cc，20 %酢酸鉛 0.4 cc を加えて遠沈した上澄を 480 mμ フイルターを使用しイトー光電比色計で比色定量した。測定結果は Fig. 2 に示す通りである。なお，クロチンの代りにビタミンAを使用した場合も，該酵素の最適温度は全く同じと考えられる。

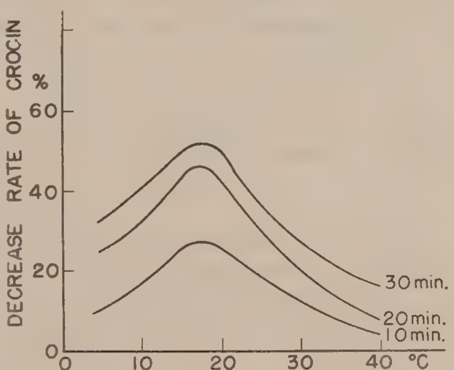


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of crude mackerel liver enzyme.
reaction pH : 7.0.
methylester of fatty acid of linseed oil : 60 mg.
acetone solution.

Ⅲ 考察および要約

G. N. Smith, J. B. Sumner[2]はリノール酸メチルエステルを基質にして大豆リポキシダーゼの最適 pH を測定して 6.5 を，福場[4]は微酸性とのべており，R. T. Holman[7]はリノール酸ナトリウムを基質にしたとき 8.4〜9.5 としている。また M. M. R. Khan[3]はニシン血合肉のリポキシダーゼの最適 pH は 6.9 であるとし，小野・永山[9]はサバ肝臓のリポキシダーゼ様酵素の最適 pH は大豆油を基質にした場合 8.0，サバ肝油を使用した場合 6.5 であるとのべている。私達は亜麻仁油脂肪酸メチルエステルを基質にしてサバ肝臓リポキシダーゼ様酵素の最適 pH を測定したところ，Fig. 1 に示すように 6.8〜7.0 となつた。M/20 燐酸緩衝液の代りに，M/50 燐酸緩衝液を使用して pH を調節した場合も，HCl または NaOH で調節して試験した場合も，共に殆んど同じ結果を得たので，サバ肝臓リポキシダーゼ様酵素の最適 pH は上記諸報[2)3)4)]と同様に微酸性域にあり，その活性もまたこれらの報告[2)3)4)]と同様にアルカリ側に比較し，酸性側で低下するので，サバ肝臓リポキシダーゼ様酵素に対する pH の影響は，従来のリポキシダーゼに関する報告と同じである。またヘミンによる脂肪酸酸化に対する pH の影響を測定したところ，Fig. 1 に示すように，酸化作用は酸性側で著しく阻止されるが，これについては後報でのべる。

リポキシダーゼの最適温度については，J. B. Sumner, A. L. Dounce[5]，G. N. Smith[6]は大豆リポキシダーゼで 25°C であるとしているが，R. T. Holman[7]は 30°C，浅田[10]は 10°C 附近であると報告している。また M. M. R. Khan[3]は，ニシン血合肉のリポキシダーゼは 15°C であるとのべている。私達がサバ肝臓酵素液で測定した結果は，Fig. 2 に示すように，最適温度は 17°C 附近であり，上記諸報[3)5)6)7)10)]

ほゞ中間値を得た。なお，その活性もまた大豆リポキシダーゼ[5)6)7)]およびニシンリポキシダーゼ[3)]と同様に低温にくらべ高温で著しく低下する。

M.M.R. KHAN[3)]、小野等[9)]の報告および前報[1)]等で植物リポキシダーゼと全く同じ作用を行う[illegible]にも存在することが推察されるが、最適温度に多少の差異が認められ、果してこの酵素が植物リポキシダーゼと同一酵素であるかどうかを、以上の実験で結論する事は困難であり、今後の研究で明らかにしたい。

本研究に当り、種々御懇切な御指導並びに御校閲をいたゞいた東京大学農学部教授森高次郎博士に深謝の意を表する。なお，本研究の一部は文部省科学研究費によつた。併せて謝意を表する。

Ⅳ 文　　献

1) 清水・福原： 本誌, **23**, 115 (1155).
2) J.B. SUMNER and G.N. SMITH : *Arch. Biochem.*, **14**, 87 (1947).
3) M.M.R. KHAN : *J. Fish. Res. Board Can.*, **9**, 393 (1952).
4) 福場： 農化, **26**, 170 (1953).
5) J.B. SUMNER and A.L. DOUNCE : *Enzymologia*, **7**, 130 (1939).
6) G.N. SMITH : *Arch. Biochem.*, **19**, 133 (1948).
7) R.T. HOLMAN : ibid., **15**, 403 (1947).
8) 福場： 農化, **25**, 485 (1952).
9) T. ONO and F. NAGAYAMA : *J. Tokyo Univ. Fish.*, **41**, No. 2, 153 (1955).
10) 浅田： 生化学, **24**, 129 (1952).

魚油の変敗に関するポーラログラフ的研究—IV.

菊 池 武 昭・岡 田 郁 之 助
（東京水産大学化学教室）

Polarographic Studies on the rancid fish-oil—IV.

Takeaki KIKUCHI and Ikunosuke OKADA

In the former paper the authors examined experimentally the polarography of rancid fish-oil and obtained an interesting result.

Since the decemposition products of fats and oils are known to contain some volatile substances, so we examined in this report the application of polarography to the volatile compounds in rancid fats and oils.

The aeration method was used because the volatile substances are easily expelled by the air current and catched by the solution which works at the same time as the supporting electrolyte in the polarographic technique.

A chromatography on 2.4-dinitrophenylhydrazones of the volatile components has been carried out and the results were discussed of their relation to the above polarography.

緒　　言

前報[1]迄著者等は油脂の変敗をポーラログラフ的に追求する事を試み，油脂変敗生成物によると考えられるポーラログラフ波を見出し，その生成物の一部は脂肪酸の酸化物であるカルボニル化合物である事を推定した。この中には揮発性物質の含まれる事が考えられるので，本報に於ては変敗生成物中，50°C で揮発する物質について，ポーラログラフ法による追求が可能であるか否か，実験を試みた結果について述べる。

ポーラログラフ法を応用して空気中のフォルムアルデヒドを定量する試みとして，支持塩となるべきアルカリ溶液に測定すべき空気を一定時間通過させ、通気前後のアルカリ溶液のポーラログラムを比較して，フォルムアルデヒドの量を測定している報告[2]がある。此の方法を参考として，油脂酸化中に生ずる生成物をポーラログラフ法によつて考察した。著者等は，酸化油脂試料を作る1つの方法として，加温通気法を用いたが、此の際酸化油脂中を通過した空気は，当然油脂の変敗生成物を含み，これを適当な溶液に吸収せしめ，通気前後の溶液のポーラログラムを比較する事によつて、変敗生成物のポーラログラフ的追求が可能であると考えた。

この揮発性物質中には，カルボニル化合物の存在が考えられるので，これを追求する為，酸化油脂中を通した空気を 2.4 DNPH (2.4 Dinitrophenylhydrazine) 溶液中を通過させ，カルボニル化合物をその誘導体として沈澱させ，クロマトグラフによつて分離考察する事を併せ試みた。

実　験　の　部

使用したポーラログラフは，前報記載と同様，柳本製写真記録式のもので，ガルバノメーターの感度は 1.04×10^{-9} amp./mm./m. である。

油脂試料は，鰮油，鮪油，イカ油，鯨油，牛脂，豚脂、大豆油，オレイン酸，リノール酸，リノレン酸等を使用した。

実験方法

油脂試料約 100 g，を硝子磨合せの洗気瓶中に入れ、湯浴中で 50°C に加熱しつゝ通気し，油脂試料中を

1957 年6月3日受理

通過した空気を 0.1 N LiOH 50 ml. 及び 2.4 DNPH 硫酸溶液 50 ml. を入れた硝子磨合せ2個の洗気瓶中を各々通過し得る如く装置し，7日間通気した。

通気は常温に於て行うのが適当と考えたが，固体脂との条件を一致させる為と，酸化を促進させる事も考えて加温を選んだ。別に同一の条件で実験室内の空気を吸収せしめたものを対照とした。

0.1 N LiOH 溶液は油脂試料中通気前後のポーラログラムを求めて比較考察した。油脂試料中には高価な物質（主に脂肪酸）があり，多量に使用するのに困難な点があり，上記の如く少量の試料を用いたが，魚油等は多量に使用し得るので，5〜10 倍量の油脂試料を用い，揮発性物質を前記と同様，炭酸ソーダ溶液に充分吸収せしめた後，この溶液中に亜硫酸ガスを通じて酸性に至らしめ，附加物を生成させ，再びアルカリ性として水蒸気蒸溜を行い，生成した附加物の原物質を溜出液として分取し，この溜出液に LiOH を支持塩としてポーラログラムを求め，揮発性物質中亜硫酸附加物を生ずると考えられるカルボニル化合物がポーラログラフ的に追求し得るや否やを検討した。同蒸溜液は下記と同様 2.4 DNPH を生ぜしめ，クロマトグラフ法によつて分離決定する事を試みた。

油脂中を通過した空気を 2.4 DNPH に吸収せしめたのは，通気終了時には黄色乃至橙黄色の沈澱を生ずるが，これを常法により再度再結晶せしめ，カラムクロマトグラフ法によつて分離し，比較的多量に得られたものについては，精製後融点を測定して概当物質を推定する事を試みた。1回の通気によつて得られる誘導体の収量は少いので，上記通気実験2〜3回分を合してカラムクロマトグラフにかけた。カラムクロマトグラフに使用した充填剤は，シリカゲル：アルミナ=2：1 で，シリカゲルは Mallinckrodt chem. work 製アルミナは和光純薬製クロマトグラフ用を活化性して使用した。使用した展開剤は，ベンゼン・エーテル混合溶媒である。

実験結果及び考察

酸化油脂中を通過した空気を吸収せしめた 0.1 N LiOH 溶液のポーラログラムは Figs. 2, 3 に示す如くである。

−1.9 V 附近に明瞭な還元波を示し，対照の実験室内の空気を通過せしめた 0.1 N LiOH 溶液は，この電位に還元波を示さぬので，この −1.9 V 附近に生ずる還元波は，油脂変敗生成物による事が明らかとなつた。酸化油脂を支持塩として LiOH を加えて求めたポーラログラム中油脂の変敗に関与する還元波の電位は前報にも述べた如く −1.9 V 附近であるので，恐らくその物質又はその一部が揮発性の物質であり，上記の如き結果を得たものと推定し得るが，変敗油脂中にポーラログラフ波となつて現れる物質すべてが，揮発性物質によるか否か，こゝでは明らかにし得ない。

この還元波を示す物質は，酸化の進まぬ油脂中に含まれる揮発性物質による事も考えられるが，前報に述べた如く，この還元波高は油脂の酸化が進むにつれて増加するので，油脂の変敗生成物によると考えて差支えないと思う。

試料の種類を比較的多種（魚油，水棲哺乳動物油，哺乳動物脂，植物油，不飽和脂肪酸）用いたが，その結果は同一傾向であつた。ポーラログラムの図示は2例についてのみ行い，他は重複するので省略し，結果のみを Table 1 に示した。

鯨油を試料として揮発性物質をより多量に炭酸ソーダ溶液に吸収せしめ，後亜硫酸ガスを通じて亜硫酸附加物を生ぜしめ，更に又アルカリ性として水蒸気蒸溜を行い，附加物として得られた原物質を溜出液として分取し，LiOH を支持塩として求めたポーラログラムは Figs. 2, 3

Fatty material (A)
↓ aeration at 50°C for 7 days
Oxidized fatty material (B)
↓
0.1 N LiOH involved volatile compounds (C)
↓ treate with SO_2 gas
$NaHSO_3$ addition products
↓ add Na_2CO_3 and steam distille
Distillate (add 0.1 N LiOH for supporting electrolyte) (D)

Fig. 1. Separation of volatile compounds in oxidized fatty materials. A, B, C and D were used for polarographic determination

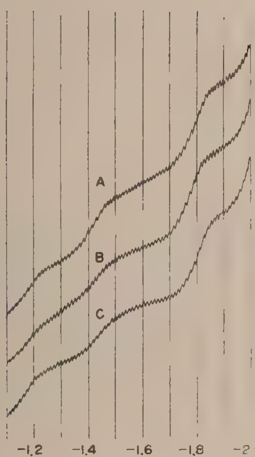


Fig. 2. Polarograms of volatile substance in oxidized whale oil.
A : oxidized whale oil in 0.1 N LiOH; B : 0.1 N LiOH absorbed the volatile substance in oxidized whale oil, C : distillate as shown in Fig. 1, D.

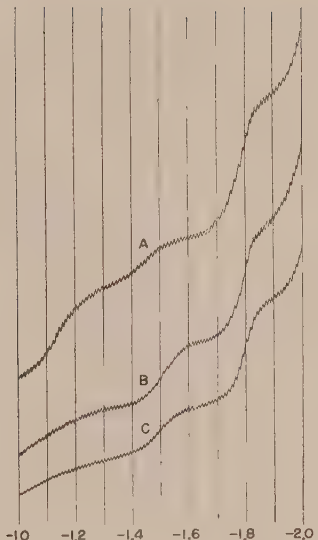


Fig. 3. Polarograms of volatile substance in oxidized oleic acid.
A : oxidized oleic acid, B : 0.1 N LiOH absorbed the volatile substance in oxidized oleic acid, C : distillate as shown in Fig. 1, D.

の如くである。

得られた還元波の電位は −1.9 V vs. S.C.E. であり，前に揮発生物質について得られたものと同一電位を示した。脂肪酸類については，行い得なかつたものもあるが，種々の油脂についての結果は鯨油と同一の傾向であつた。ポーラログラムの図示は，鯨油及びオレイン酸の場合について行い，他は Table 1 に結果のみを示した。

此の実験から，空気中のフォルムアルデヒドの定量の如く，変敗油脂中に生ずる揮発性物質のポーラログラフ的追求が可能である事が明らかとなつた。

このポーラログラフ波を示す物質を追求するため，酸化油脂中を通過した空気を 2.4 DNPH 溶液に導き誘導体として沈澱せしめ，カラムクロマトグラフによつて分離した結果，8種前後の色帯を得，その中融点を測定し得たものは約3種であつた。

この 2.4 DNPH 誘導体として得られた物質は，確と酸化油脂中に生ずるポーラログラフ還元波を示す物質と決定するのは難かしいが，幾分の参考となると考えて実験を行つたものである。

Table 1. Polarographic reduction wave having a half-wave potential of −1.9 V vs. S.C.E. in fatty materials and volatile compounds separated from them. A, B, C and D were represent in Fig. 1.

Fatty material	A	B	C	D	Fatty material	A	B	C	D
Sardine oil	−	+	+	+	Beef tallow	−	+	+	+
Tunny fish oil	−	+	+	+	Soy bean oil	−	+	+	+
Calamary oil	−	+	+	+	Oleic acid	−	+	+	
Whale oil	−	+	+	+	Linolic acid	−	+	+	
Lard	−	+	+	+	Linolenic acid	−	+	+	

アルカリ溶液に油脂変敗生成物を通気によつて吸収せしめ，後亜硫酸附加物として，これを水蒸気蒸溜によつて原カルボニル化合物を分離した溜分より 2.4 DNPH 誘導体を生ぜしめ，カラムクロマトグラフによつて分離した結果、酸化油脂中を通つた空気を 2.4 DNPH 溶液に導いた場合と略々同様の色帯を得，その中融点を測定し得る程度の量を得たものは 162～4°C，153～156°C，104～107°C，102～5°C であつた。これ等の物質は誘導体を作る前にポーラログラフ波を示しているので，誘導体として得られた物質は変敗油脂中に還元波となつて現れる物質と同一である可能性が大きい。然し融点を測定し得たのは、これらの物質の一部であり、ポーラログラフ波を示す物質中融点を測定し得たかつた部分の物質による事も一応吟味せねばならぬが，この実験内ではその吟味迄は行い得なかつた。

誘導体として得られた物質は，アルデヒド又はケトンであると考えるが，その中ポーラログラフ波を示す物質はアルデヒドによる可能性が多いので，得られた融点よりアルデヒドに注目して考察して見ると，比較的低級の脂肪属アルデヒドではないかと考えられる。融点の測定のみでは、仮にアルデヒドであるとしても炭素数の僅かの違では融点の差の少ないものもあるので，確とした決定は行い得ない。この決定にはペーパークロマトグラフ法が有効と思い，前報に於ける酸化脂肪より分離したカルボニル区よりの 2.4 DNPH 誘導体等とも併せて行つて，若干の結果が得られているが，これらについては後の報告にゆずる。

誘導体として得られた物質が数種含まれているにも拘らず，ポーラログラフ波は －1.9 V vs. S.C.E. 1つだけであるが，これら数種の物質のポーラログラフ的性質が類似するため，還元波が重つて現われたものと考える。

従つて，これらの揮発性物質がアルデヒドであるとしても，ポーラログラフ的には個々に定量し得ないが，それ等の含量を総量として推定するに足ると考える。

誘導体として得られた物質は融点しか測定し得なかつたので，確とした事は云えぬが，アセトアルデヒド，プロピオンアルデヒド，カプロンアルデヒドの如き低級のアルデヒドではないかと考える。アセトアルデヒド及びプロピオンアルデヒドは，還元電位が炭素数3以上のアルデヒドより幾分陽であり，Figs. 2，3 に僅か乍らその存在が伺えるように思われる。

摘　　要

（1） ポーラログラフ法によつて，魚油等の変敗生成物中室温に近い温度で揮発する物質の追求を試みた。

（2） 揮発性物質を LiOH 溶液に吸収せしめて，ポーラログラフ波を得る事が出来，この還元波は前報に於て変敗油脂中に得たものと同一であろうと推定した。油脂の変敗生成物中には，ポーラログラフ波を示す揮発性物質が含まれ，それを追求する事が可能である事を認めた。

（3） 揮発性物質を 2.4 DNPH 誘導体として，カラムクロマトグラフによつて分離した結果，低級アルデヒドと考えられる物質が得られ，これらが油脂の変敗に関与する物質中ポーラログラフ波を示す物質であろうと推定した。

終りに，本研究を行うに当り御懇篤なる御指導を賜つた京都大学教授館勇博士，有益な御助言を賜つた本学助教授野中順三九博士，実験の御援助を頂いた君山宗一，西山静夫の諸氏に深甚の謝意を表する。本研究の一部は，文部省科学研究費によつた。附記して謝意を表する。

文　　献

1） 菊池・岡田： 本誌 **22**，589 (1957).

2） Whitnack, G.C. et al： Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed. **16**, 496 (1944).

魚油の変敗に関するポーラログラフ的研究—V.

菊 池 武 昭・岡 田 郁 之 助
(東京水産大学化学教室)

Polarographic Studies on the Rancid Fish-oil—V.

Takeaki KIKUCHI and Ikunosuke OKADA

In the former paper the authors obtained a well defined polarographic wave which was caused by the oxidation products of fats and oils. It seems that the compound to produce the polarographic wave in oxidized fat and oil is not caused by a single substance, but several substances are related to it. Therefore in this report the authors describe a trial to separate the volatile compounds produced during the autoxidation of fats and oils by the systematic steam distillation. In this report the following results are obtained.

1) A well defined polarographic wave given by the volatile portion of the oxidized fats and oils had a half-wave potential of −1.9 V vs. S. C. E.

2) Separation by steam distillation revealed that the compound giving polarographic wave was aldehyde fraction of the volatile matter formed in the autoxidation of the fats and oils.

緒 言

前報迄，著者等は油脂の変敗をポーラログラフ法によつて追求し，油脂変敗生成物によると考えられる還元波を見出し，この還元波を与える物質の一部は，脂肪酸の酸化によつて生成したカルボニル化合物であろうと推定した。

変敗生成物は単一の物質によるのではなく，多くの物質が関係している事が予想され，第 IV 報[1]に於て述べた如く，揮発性物質が考えられるので，本法に於ては水蒸気蒸溜によつて、変敗生成物中揮発性の物質を分離し，ポーラログラフ的に追求した結果について報告する。

実 験 の 部

使用したポーラログラフは，前報記載と同様，柳本製写真記録式のものである。

試料油脂は鰮油，鮪油，イカ油，鯨油，牛脂，豚脂，大豆油，オレイン酸，リノール酸，リノレン酸を使用した。

実験方法

下記に示す水蒸気蒸溜法 (SHRINER)[2] によつて各溜分及び残渣に分離し，ポーラログラフによつて −1.9 Vの還元波を示す部分を追求し，ポーラログラフ波を示した部分は再溜して，各溜分について検討した。別にポーラログラフ波を示す部分の 2.4 dinitrophenylhydrazine (2.4 DNPH) 誘導体を作り，クロマトグラフ法によつて分離して，その性質を調べた。

水蒸気蒸溜による揮発性物質の分離

(i) 酸化油脂 50 g を 500 ml 容丸底フラスコにとつて，水蒸気蒸溜を行い，蒸溜液 I を 50〜60 ml 集める。

(ii) 蒸溜液 I は燐酸で酸性とし，水蒸気蒸溜し，蒸溜液 II を約 50 ml 集める。残渣 II は稀苛性ソーダ溶液で弱アルカリ性とし，再び水蒸気蒸溜して蒸溜液を集める。

(iii) 蒸溜液 II は稀苛性ソーダ溶液で弱アルカリ性とし，再び蒸溜して蒸溜液 III を 30〜40 ml を集める。一般に蒸溜液 III は揮発性の中性化合物，アルコール，アルデヒド，ケトンを含む。残渣 III は酸性化合物の Na 塩である。

1957 年 6 月 3 日受理

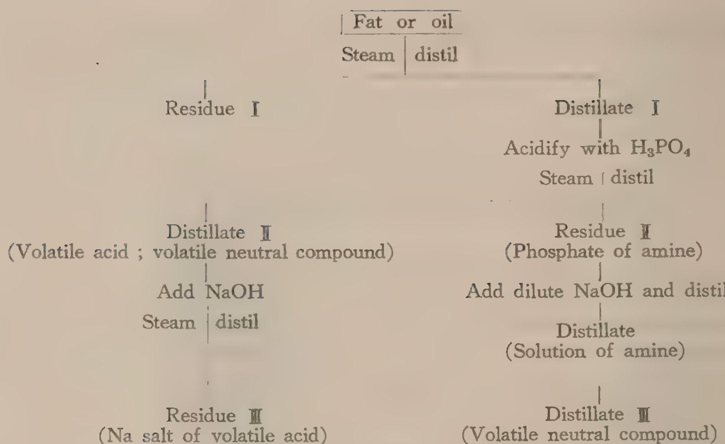


Fig. 1. Schematic diagram of separation of water soluble compounds.

上記の方法で，酸化した鰮油，鮪油，イカ油，鯨油，牛脂，豚脂，大豆油，オレイン酸，リノール酸，リノレン酸の 10 種について水蒸気蒸溜を行い，蒸溜液 3 種及び残渣 3 種をとり，未酸化の試料についても同様な操作によつて蒸溜液を分別し，計 120 種の区分について，その各々のポーラログラムを求めて比較考察した。使用支持塩には 0.1 N LiOH 溶液 5 倍量を用いた。

実験結果及び考察

鯨油及びオレイン酸を試料として水蒸気蒸溜によつて分離した各溜分及び残渣のポーラログラムは Figs. 2, 3 に示す如くである。その他の試料についても同様な結果が得られたが図示は省略し，重複を避けてその一部を Table 1 に示した。蒸溜液 1, 2, 3 に −1.9 V vs. S.C.E. の還元波が現れ，残渣 1, 2, 3 に現れぬところから，油脂の変敗生成物中ポーラログラフ還元波を示す物質は，揮発性を有する事が明らかとなつた。

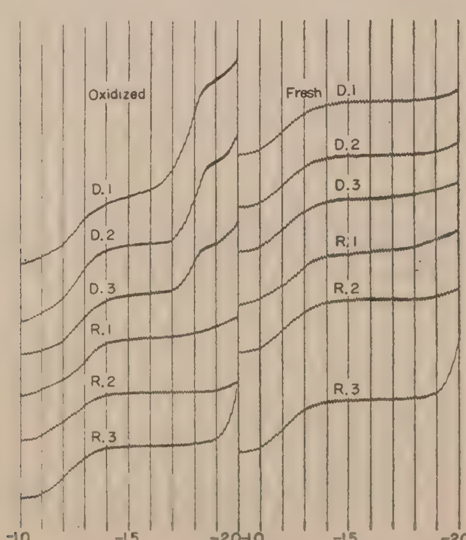


Fig. 2. Polarograms of distillates and residues in 0.1 N LiOH—Whale oil.
D., distillate ; and R., residue.

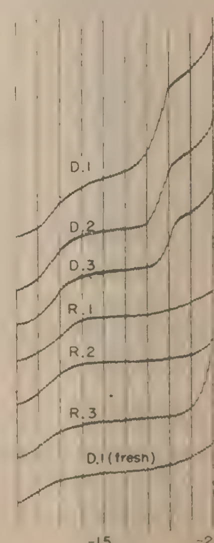


Fig. 3. Polarograms of distillates and residues in 0.1 N LiOH—Oleic acid.
D., distillate ; and R., residue.

Table 1. Characteristics of distllates and residues of fresh and oxidized fatty materials.

Sample \ Method of test	Shiff	Brady	Polaro	Sample \ Method of test	Shiff	Brady	Polaro
Oxidized Sardine oil				Oxidized Soy-bean oil			
D. 1 (fresh)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 1 (fresh)	+(−)	+(−)	+(−)
D. 2 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 2 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)
D. 3 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 3 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)
R. 1 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 1 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)
R. 2 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 2 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)
R. 3 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 3 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)
Oxidized lard				Oxidized Linoleic acid			
D. 1 (fresh)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 1 (fresh)	+(−)	+(−)	+(−)
D. 2 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 2 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)
D. 3 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)	D. 3 (〃)	+(−)	+(−)	+(−)
R. 1 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 1 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)
R. 2 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 2 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)
R. 3 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)	R. 3 (〃)	−(−)	−(−)	−(−)

Shiff : Shiff's reaction; Brady : Brady's reaction; Polaro : Polarographic reduction wave in 0.1 N LiOH soln.

Table 2. Characteristics of further separation of D. 3—Oxidized whale oil.

B.P	Color	Shiff	Polaro	B.P	Color	Shiff	Polaro
D. 3	Light yellow	+	+	96～100	Colorless	±	±
<80°C	Colorless	+	+	101～105	〃 〃	−	−
81～90	〃	+	+	105～110	〃	±	±
91～95	〃	+	+	>111	Light yellow	+	+

Shiff : Shiff's reaction; Polaro : Polarographic reduction wave in 0.1 N LiOH.

この還元波は，前に著者等が変敗油脂中に得られたものと同一電位である。又この還元波を与える物質はその分離区分から見ると，アルコール，アルデヒド，ケトンの中の物質という事になる。前報に於ては一寸触れたが，これら3者の中，ポーラログラフ波を示す可能性の強い物質はアルデヒドであり，析出電位から見ても脂肪属の低級アルデヒドであると推定し得る。詳細の考察は後の報告に述べる予定である。

次に，より多くの溜分をとり，更に分溜して概当物質をとり出す事を試みた。即ち約 10 kg の酸化させた鯨油を原料とし，上記と同様の方法で蒸溜液Ⅲを約 2l. 集め，これを würtz の分溜管を附して分溜し，各区のポーラログラムを求めた結果は Table 2 の如くである。その結果，種々の分溜区分に −1.9 V vs. S.C.E の還元波が現れ，種々の B.P. を有する物質が混在する事が推定されたが，各溜分の量が少く，充分分離精製して直接これらの性質を追求する事は困難であつた。各分溜区は出来るだけ注意して分溜したが，他物質の混入も考えられぬ事はないので，確とした事は云えない。

従つて，蒸溜液Ⅲの部分を 2.4 DNPH 誘導体とし，カラムクロマトグラフによつて分離して，概当物質を推定する事とした。前報[1] に於けると同様，シリカゲル・アルミナを充填剤とし，ベンゼン・エーテルを展開剤として 2.4 DNPH の誘導体を分離した結果、各々の試料について 153～5°C，105～7°C，102～4°C の融点を有する物質が得られ，他に4～5種（融点測定に充分でない量）の色帯が得られた。融点のみでは物質の決定は行い得ないので，ペーパークロマトグラフによつて行う事とした。この結果はまとめて後で報告したいと考えている。

摘　要

（1） 魚油等の油脂試料の酸化物について，揮発性物質を水蒸気蒸溜法によつて分離し，ポーラログラフ法によつて追求する事を試みた。

（2） 蒸溜液の区分に，前に著者等が油脂の変敗に関与するポーラログラフ波と推定したものと同一の還

元波が得られたので，油脂変敗生成物中，ポーラログラフ波を示す物質は主に揮発性物質による事が明らかにされた。

（3） 前報にも推定した如く，このポーラログラフ還元波を示す物質は低級のアルデヒドによる可能性が強くなつた。

終りに、本研究を行うに当り御懇篤なる御指導を賜つた京都大学教授[illegible]勇博士、有益な御助言を賜つた本学助教授野中順三九博士，実験の御援助を頂いた会沢和雄の諸氏に深甚の謝意を表する。本研究の一部は文部省科学研究費によつた。附記して謝意を表する。

文　　　献

1) 菊池・岡田： 本誌，**23**，3，(1957).

2) R.L. Shriner and R.C. Fuson： The Systematic Identification of Organic Compounds p. 293 (1948).

雑　　録

○ 6 月 理 事 会

1. 開催日　昭和 32 年7月6日
2. 場　所　東京水産大学会議室
3. 出席者　田内会長，松江編集長，理事 16 名
4. 議　事
   a. 入会希望者承認　個人会員 14
   　　　　　　　　　賛助会員 6
   b. 年会記念号の件
   昭和 32 年度年会委員長川田氏から年会経費の残余金を学会に寄附したいとの申出があつたので，受入れ及び使途に就いて協議した結果，年会記年号を発刊することゝした。尚同号えの投稿者は年会で研究発表の講演を行つた者の内から投稿希望者を募ることゝし，発行は 10 月頃と予定した。

○ 九 州 支 部 例 会　7月6日　於宮崎大学農学部

1. 魚体のコハク酸脱水素酵素に関する研究。Ⅲ，Suc，DH の活性度と PH との関係について．Ⅳ，Suc．DH の活性度のと温度との関係について　°福田博業，黒木　暘（宮大・水産）
2. 上五島産マアジ生殖巣の季節的変化に就て　°水江一弘・古賀重行・松尾昭良（長崎大・水産）
3. メバルの年令と成熟について　相川広秋・°三尾真一（九大・水産）
4. 産卵調査によるカタクチ卵，稚仔の分布の変化について　°浅見忠彦・野村星二（南海区水研延岡支所）
5. カタクチシラスの脊椎骨数変異による南海および内海域のカタクチの発生および成育の方向の型　浅見忠彦（南海区水研延岡支所）
6. 魚群調査による各魚種の混在状況　神浦藤雄（南海区水研延岡支所）
7. 幼，稚魚の食性の一端　横田滝雄（南海区水研延岡支所）
8. 底魚類の摂餌率の日週期について　通山正弘（南海区水研延岡支所）
9. 太平洋南区のサメ・エイ類の分布　工藤晋二（南海区水研延岡支所）
10. 太平洋南区中型底曳網漁業の性格　横田滝雄（南海区水研延岡支所）

○ 技術士法について

第 26 通常国会で「技術士法」が成立し，去る 5 月 20 日公布となつた。

この法律（昭和 32 年 5 月 20 日付官報に掲載）の主たる内容は，(1) 技術士の資格，(2) 技術士試験，(3) 登録，(4) 技術士の義務，(5) 技術士審議会の五つからなつている。

この法律により，技術士試験に合格し，科学技術庁に所定の登録を行えば，政府公認のコンサルタントとして「技術士と称することが出来る（従つて又，法律発効後は技術士という名称は勝手に使用出来なくなる。又一方技術士としての信用を傷つけたり，又業務上知り得た依頼者側企業の秘密を他人に漏洩することなきように厳しい禁止規定を設けてある。

尚本法律については，日本技術士会（東京都中央区銀座東七丁目・工業技術院内）に申込めばプリントが送付される。

お 詫 び

Vol. 23, No. 2 昭和 32 年度秋期大会開催公告の末尾に水産学会秋期大会委員長田村保とあるのは田村正の誤りです。謹しんでお詫びすると共に，御訂正をお願いします。

訂 正 (ERRATA)

	誤	正
Vol. 23, No. 1, p. 47, 22 行	carb	crab
24 行	METHOD	METHODS
p. 49, 1 行	elswhere	elsewhere
p. 51, 2 行	I=1.0	*I*=1.0
〃	I=0.4	*I*=0.4
No. 2. p. 95, 1 行	Determination of protein in solution	*Determination of protein in solution*
4 行	Streaming birefringense	*Streaming birefringence*
14 行	Superprecipitation	*Supreprecipitation*
19 行	ATP sample	ATP *sample*
21 行	Salting-in range	*Salting-in range*
26 行	Isoelecric point (*Pl*)	*Isoelectric point* (*PI*)
28 行	*pl*	*pI*
p. 96 Fig. 2 最下行	both	bath
p. 99 6 行	Curves B and C	Curves D and E
p. 99 Fig. 5 4 行	Tude	Tube
p. 101 5 行	oompact	Compact
p. 102 13 行	similarlities	similarities
39 行	fractionsas	fractions as

昭和三十二年七月二十日 印刷
昭和三十二年七月二十五日 発行

第二十三巻 第三号

本号定価 110円
(送料別)

編集兼発行者 松 江 吉 行
東京都港区芝海岸通り6丁目 東京水産大学内

発 行 所 日 本 水 産 学 会
東京都港区芝海岸通り6丁目 東京水産大学内
振 替 口 座 東 京 59529番

印 刷 者 篠 原 収 二

印 刷 所 東海出版印刷株式会社

発 売 所 東海出版印刷株式会社
東京都中野区江古田3の1223
電 話 中 野 (38) 4101・9108